

Aus der Medizinischen Klinik I der Universität München

Klinikum Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

EINFLUSS VON ADRIAMYCIN UND ANDEREN ZYTOSTATIKA  
AUF DIE AKTIVITÄT VON  $\text{Ca}^{++}$ -ABHÄNGIGEN ATPasen,  
 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{++}$ -AUSTAUSCH UND CALMODULIN AN SUBZELLULÄREN  
FRAKTIONEN VON MYOKARDZELLEN UND ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Peter Rosenbeiger

aus  
München

1986



Aus der Medizinischen Klinik I der Universität München

Klinikum Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

EINFLUSS VON ADRIAMYCIN UND ANDEREN ZYTOSTATIKA  
AUF DIE AKTIVITÄT VON  $\text{Ca}^{++}$ -ABHÄNGIGEN ATPasen,  
 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{++}$ -AUSTAUSCH UND CALMODULIN AN SUBZELLULÄREN  
FRAKTIONEN VON MYOKARDZELLEN UND ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Peter Rosenbeiger

aus  
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. B. Höfling

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 4. 1986

Einfluß von Adriamycin und anderen Zytostatika  
auf die Aktivität von  $\text{Ca}^{++}$ -abhängigen ATPasen,  
 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{++}$ -Austausch und Calmodulin an subzellulären  
Fraktionen von Myokardzellen und Erythrozyten

Peter Rosenbeiger







# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                              | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                                                                                | 1     |
| 1.1. Chemische Struktur und Metabolismus von Adriamycin                                                                                      | 1     |
| 1.2. Klinische Bedeutung von Adriamycin                                                                                                      | 2     |
| 1.3. Kardiotoxische Nebenwirkungen von Adriamycin                                                                                            | 3     |
| 1.4. Derzeitige Arbeitshypothesen zur Pathogenese der Adriamycin-Kardiotoxizität                                                             | 5     |
| 1.5. Zelluläre Mechanismen des $\text{Ca}^{++}$ -Transports                                                                                  | 10    |
| 1.5.1. Sarkolemm                                                                                                                             | 10    |
| 1.5.2. Sarkoplasmatisches Retikulum                                                                                                          | 12    |
| 1.5.3. Mitochondrien                                                                                                                         | 13    |
| 1.5.4. Calmodulin                                                                                                                            | 15    |
| 2. Fragestellung                                                                                                                             | 17    |
| 3. Materialien und Methoden                                                                                                                  | 18    |
| 3.1. Materialien                                                                                                                             | 18    |
| 3.2. Methodik                                                                                                                                | 18    |
| 3.2.1. Sarkolemm                                                                                                                             | 18    |
| 3.2.1.1. Isolation von Vesikeln des Sarkolemm (SL) durch Differential- und Gradienten-Zentrifugation                                         | 18    |
| 3.2.1.1.1. Bestimmung der Seitenorientierung der sarkolemmlen Vesikel                                                                        | 20    |
| 3.2.1.1.2. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch an Vesikeln des Sarkolemm                                                                 | 21    |
| 3.2.1.2. Isolierung von Vesikeln des Sarkolemm (SL), des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und Mitochondrien durch Gradienten-Zentrifugation | 21    |
| 3.2.2. Sarkoplasmatisches Retikulum                                                                                                          | 23    |
| 3.2.2.1. Isolation von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Differential-Zentrifugation                                      | 23    |
| 3.2.2.2. Isolation von Calmodulin-verarmten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Differential-Zentrifugation                 | 24    |
| 3.2.3. Mitochondrien - Isolierung durch Differential-Zentrifugation                                                                          | 24    |

|          |                                                                                                                                    |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4.   | Erythrozyten-Präparation von Calmodulin-verarmten Membran-Vesikeln                                                                 | 25 |
| 3.2.5.   | Calmodulin                                                                                                                         | 25 |
| 3.2.5.1. | Präparation von Calmodulin                                                                                                         | 25 |
| 3.2.5.2. | Elektrophoretische Untersuchung von Calmodulin                                                                                     | 27 |
| 3.2.6.   | Markerenzym-Bestimmungen                                                                                                           | 28 |
| 3.2.6.1. | Glucose-6-Phosphatase                                                                                                              | 28 |
| 3.2.6.2. | 5' Nucleotidase                                                                                                                    | 29 |
| 3.2.6.3. | Citrat-Synthase                                                                                                                    | 29 |
| 3.2.6.4. | Succinat-Cytochrom c-Reductase                                                                                                     | 29 |
| 3.2.6.5. | $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase                                                                                                 | 30 |
| 3.2.7.   | Inkubationsmedien                                                                                                                  | 30 |
| 3.2.8.   | Methoden zur Phosphatbestimmung                                                                                                    | 31 |
| 3.2.9.   | Methoden zur Proteinbestimmung                                                                                                     | 32 |
| 4.       | Ergebnisse                                                                                                                         | 34 |
| 4.1.     | Sarkolemm                                                                                                                          | 34 |
| 4.1.1.   | Reinheitsprüfung                                                                                                                   | 34 |
| 4.1.2.   | Seitenorientierung der Vesikel                                                                                                     | 35 |
| 4.1.3.   | Wirkung von Adriamycin auf den $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ -Austausch des Sarkolemm                                             | 35 |
| 4.1.4.   | Wirkung von Adriamycin auf die $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase des Sarkolemm                                                    | 36 |
| 4.2.     | Sarkoplasmatisches Retikulum                                                                                                       | 36 |
| 4.2.1.   | Reinheitsprüfungen                                                                                                                 | 36 |
| 4.2.1.1. | Kontamination durch sarkolemmale Vesikel und Mitochondrien                                                                         | 36 |
| 4.2.1.2. | Elektronenoptisches Aussehen der Präparation                                                                                       | 37 |
| 4.2.1.3. | Verhalten der $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase gegenüber Kalzium, Magnesium, Kalium, pH-Wert und ATP           | 38 |
| 4.2.1.4. | Verhalten der Präparation gegenüber Vanadat, Natrium-Azid und Quabain                                                              | 42 |
| 4.2.2.   | Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR                         | 43 |
| 4.2.3.   | Hemmung der $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR durch Adriamycin bei verschiedenen Kalzium-Konzentrationen | 46 |

|          |                                                                                                                                                                          |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.4.   | Hemmung der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR durch Adriamycin bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen                                       | 47 |
| 4.2.5.   | Hemmung der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR bei unterschiedlichen Präinkubationszeiten                                                         | 48 |
| 4.2.6.   | Wirkung von Vinblastin, Vincristin und Endoxan auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR                                                          | 49 |
| 4.2.7.   | Aktivitätssteigerung der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR durch Calmodulin und c-AMP-abhängige Proteinkinase                                    | 49 |
| 4.3.     | Mitochondrien                                                                                                                                                            | 50 |
| 4.3.1.   | Reinheitsprüfung                                                                                                                                                         | 50 |
| 4.3.1.1. | Kontamination durch sarkolemmale Vesikel und Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulum                                                                                    | 50 |
| 4.3.1.2. | Elektronenoptisches Aussehen der Präparation                                                                                                                             | 50 |
| 4.3.2.   | Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die $\text{Ca}^{++}$ - und $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der Mitochondrien vom Kalb                                     | 51 |
| 4.3.3.   | Wirkung von Adriamycin auf die $\text{Ca}^{++}$ - und $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der Mitochondrien vom Hund                                                      | 52 |
| 4.4.     | Erythrozyten                                                                                                                                                             | 52 |
| 4.4.1.   | Abhängigkeit der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase von Calmodulin                                                                                       | 52 |
| 4.4.2.   | Wirkung von Adriamycin auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten mit und ohne Stimulation durch Calmodulin                              | 53 |
| 4.4.3.   | Wirkung von Vinblastin, DTIC, Endoxan und Bleomycin auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten mit und ohne Stimulation durch Calmodulin | 54 |
| 4.5.     | Calmodulin - Gelelektrophoretische Untersuchung                                                                                                                          | 56 |
| 5.       | Besprechung der Ergebnisse                                                                                                                                               | 57 |
| 5.1.     | Sarkolemm                                                                                                                                                                | 57 |
| 5.1.1.   | Präparation und Charakterisierung der sarkolemmalen Vesikel                                                                                                              | 57 |
| 5.1.2.   | Einfluß von Adriamycin auf den $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{++}$ -Austausch und die $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase                                                    | 58 |
| 5.2.     | Sarkoplasmatisches Retikulum                                                                                                                                             | 59 |
| 5.2.1.   | Präparation und Charakterisierung des sarkoplasmatischen Retikulum                                                                                                       | 59 |
| 5.2.2.   | Einfluß von Adriamycin und Adriamycinol auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase                                                                        | 61 |

|        |                                                                                                                                    |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.3. | Einfluß von Vinblastin, Vincristin und Endoxan auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase                           | 62 |
| 5.2.4. | Steigerung der Aktivität der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase durch Calmodulin und c-AMP-abhängige Proteinkinase | 62 |
| 5.3.   | Mitochondrien                                                                                                                      | 63 |
| 5.3.1. | Präparation und Charakterisierung der Mitochondrien                                                                                | 63 |
| 5.3.2. | Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die $\text{Ca}^{++}$ - und $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase                          | 64 |
| 5.4.   | Erythrozyten                                                                                                                       | 64 |
| 5.4.1. | Wirkung von Adriamycin auf die Calmodulin-stimulierte $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase                            | 64 |
| 5.4.2. | Wirkung von Vinblastin, DTIC, Endoxan und Bleomycin auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase                      | 65 |
| 6.     | Zusammenfassung                                                                                                                    | 66 |
| 7.     | Verzeichnis der Abkürzungen                                                                                                        | 68 |
| 8.     | Literaturverzeichnis                                                                                                               | 69 |
| 9.     | Danksagung                                                                                                                         | 86 |
| 10.    | Lebenslauf                                                                                                                         | 87 |

## 1. Einleitung

### 1.1. Chemische Struktur und Metabolismus von Adriamycin

Adriamycin ist ein Zytostatikum aus der Klasse der Anthracyclin-Antibiotika. Es wurde 1969 von Arcamone und Mitarbeitern aus *Streptomyces peucetius* und *caesius* isoliert (Lit. 27). Das Molekulargewicht beträgt für Adriamycin 543 g/Mol und für Adriblastin<sup>(R)</sup> (Adriamycin-HCL) 579.9/Mol.

Das Adriamycin-Molekül ist ein planares Ringsystem mit lipophilen (Hydroxyl-Gruppen) und hydrophilen (Amino-Zucker) Zentren, besitzt saure (Phenol-Gruppen) und basische (Amino-Zucker) Bindungsstellen. Nach Entfernung des Amino-Zuckers entsteht ein wasserunlösliches Aglycon (Lit. 11).

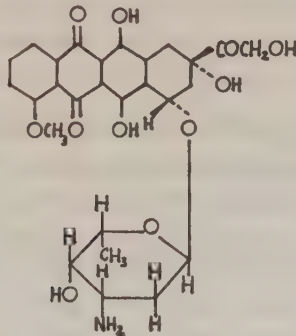


Abb. 1: Strukturmodell von Adriamycin

Die chemische Struktur wird als Erklärung für die zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten von Adriamycin angeführt. Adriamycin reagiert mit Nukleinsäuren (Lit. 47), Zellmembranen (Lit.106) und bildet Chelat-Komplexe mit Metallen wie Cobalt, Kupfer, Nickel, Magnesium und Eisen (Lit.166). Die Abspaltung des Zuckers (Aglycon) bewirkt einen Verlust sowohl der pharmakologischen (onkologischen) Wirkung, als auch der biochemischen Aktivität (Lit. 49).

Adriamycin reichert sich vor allem in den Nieren (16.8 µg of Adriamycin/g of tissue wet weight), der Milz (14.4), der Lunge (6.13), dem Dünndarm (4.63), dem Herzen (2.63) dem Pankreas (2.4) und der Leber (1.95) an (Lit. 11). Innerhalb der Zelle konzentriert sich Adriamycin vorwiegend in den Nuklei (Lit. 51).

Kurz nach i.v.-Applikation liegt ein wesentlicher Teil in Form des reduzierten Metaboliten Adriamycinol vor, welcher als pharmakologisch wirksam gilt (Lit. 11). Benjamin et al. konnten neben Adriamycinol und dem Aglycon noch vier weitere Metaboliten nachweisen (Lit. 16).

Adriamycinol entsteht durch Reduktion von Adriamycin durch die Aldo-Keto-Reductase (Kofaktor NADPH). Dieses Enzym ist in sehr vielen Organen und in Tumorgewebe im Cytoplasma vorhanden (Lit. 10). Die physiologische Bedeutung der Aldo-Keto-Reductase ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde eine Funktion bei der Synthese von Ascorbin-Säure vermutet (Lit. 54).

Adriamycin und Adriamycinol können zum großen Teil in der Leber, aber auch in anderen Organen durch mikrosomale Glycosidasen (reduzierend und hydrolysierend) zu Aglyconen abgebaut werden. Dies erklärt die Beziehung zwischen Leberfunktionsstörungen und der Ausprägung der Adriamycin-Toxizität beim Menschen (Lit. 9)

Die Ausscheidung von Adriamycin erfolgt größtenteils über die Galle in Form von Adriamycinol (Ratte, Kaninchen, Hund, Mensch) (Lit. 10, 165, 19) und im Urin vorwiegend als Adriamycin (Lit. 11).

Im Dünn- und Dickdarm erfolgt ein Abbau zu Aglyconen (Lit. 11).

## 1.2. Klinische Bedeutung von Adriamycin

Adriamycin gehört zu den bedeutendsten Zytostatika, die in verschiedenen Polychemotherapie-Schemen verwendet werden (Lit. 27). Als besonders wirksam hat es sich bei der Behandlung der akuten Leukämie, malignen Lymphomen, Non-Hodgkin-Lymphomen, Ovarial-Adenokarzinomen, kleinzelligem Bronchialkarzinom und Adenokarzinomen der Mamma erwiesen (Lit. 27).

Im Vergleich zu anderen Anthracyclin-Antibiotika (z.B. Daunorubicin) besitzt Adriamycin im Tiermodell den doppelten "Therapeutischen Index" (Lit. 44). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Analogen entwickelt, von denen noch nicht sicher bewiesen ist, daß sie bei gleicher onkotherapeutischer Effektivität geringere kardiotoxische

Nebenwirkungen besitzen (Lit. 35 ). Einzig für Epirubicin (4'-epi-doxorubicin) scheint eine geringere kardiotoxische Nebenwirkung durch muskelmechanische und histopathologische Untersuchungen und Versuche mit Herzmuskelzellkulturen nachgewiesen zu sein (Lit. 60 ).

Der limitierende Faktor in der Anwendung von Adriamycin ist noch immer die kardiotoxische Nebenwirkung, die in der chronischen Form, der Adriamycin-Kardiomyopathie, bei einer Inzidenz von etwa 3 % (Lit.124) eine Letalität von 30 - 50 % zur Folge hat (Lit.124, 27).

### 1.3. Kardiotoxische Nebenwirkungen von Adriamycin

Adriamycin besitzt neben der den meisten Zytostatika eigenen Toxizität für Gewebe mit hoher Mitoserate (Knochenmark, Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes und Haarfollikel) eine ausgeprägte kardiotoxische Wirkung. Diese Kardiotoxizität manifestiert sich nach früheren Erfahrungen vor allem bei Dosen über  $550 \text{ mg/m}^2$  und stellt damit einen limitierenden Faktor in der Anwendung von Adriamycin dar (Lit. 65 ).

Es hat sich bewährt, die Adriamycin-Kardiotoxizität in akute, subakute und chronische Kardiotoxizität zu unterteilen, wobei jede Form noch nach reversibel oder irreversibel differenziert werden kann (Lit. 21, 76). Klinisch äußert sich die akute Form im EKG als Tachykardie, Endteilveränderung und verschiedenen Arrhythmieformen, vorwiegend supraventrikulären Ursprungs, die innerhalb von Minuten nach intravenöser Injektion auftreten (Lit. 55). Ferner werden Hypotensionen beobachtet, auch letales Pumpversagen durch Myokardinfarkt ist beschrieben (Lit. 76, 151).

Die subakute Kardiotoxizität ist meist eine reversible negative Inotropie, kann aber auch als Perikarditis-Myokarditis-Syndrom oder Myokardinfarkt in Erscheinung treten (Lit. 21 ).

Die sogenannte Adriamycin-Kardiomyopathie, die chronische Form der Adriamycin-Kardiotoxizität, zeigt in der reversiblen Form Zeichen des Linksherzversagens und-irreversibel ein therapierefraktäres Herzversagen mit einer Dilatation aller vier Herzbinnenräume (Lit. 20 ).

Bei der akuten und subakuten Form ist das histologische Bild meist unauffällig, im Fall der Kardiomyopathie finden sich intrazelluläre Vakuolen, eine Lyse der Myofibrillen, Zellatrophie und interstitielle

Ödeme oder interstitielle Fibrosierung. Entzündungszeichen sind minimal oder überhaupt nicht vorhanden (Lit. 55, 19).

Elektronenmikroskopisch liegt eine Schwellung der Mitochondrien und des sarkoplasmatischen Retikulums vor, verbreiterte Z-Streifen und Reduktion der Glykogen-Granula (Lit.93).

Das histologische Bild ist in allen untersuchten Spezies (Mensch, Affe, Hund, Kaninchen, Ratte und Maus (Lit.167)) vergleichbar, wobei Billingham die Ähnlichkeit zur Katecholamin induzierten Kardiomyopathie (Lit.20) hervorhebt.

Deutliche Unterschiede bestehen aber zum histologischen Bild anderer sekundärer Kardiomyopathien, z.B. der durch Strahlung induzierten Kardiomyopathie (Lit.73). Beim Menschen sind bereits ab einer Dosis von  $240 \text{ mg/m}^2$  typische Läsionen durch Herzmuskelbiopsien nachweisbar (Lit. 19).

Neben den Anthracyclinen ist auch für andere Zytostatika eine Kardiotoxizität beschrieben:

- Cyclophosphamid aus der Gruppe der Alkylantien ist neben den Anthracyclinen die bekannteste kardiotoxische Substanz unter den Zytostatika. Hohe Dosen ( $240 - 270 \text{ mg/kg}$ ) erzeugen nach Billingham beim Kaninchen ähnliche morphologische Effekte wie Adriamycin. Die kardiotoxische Wirkung setzt Stunden bis Tage nach Applikation von Cyclophosphamid ein (Lit. 20 ).
- Eine weitere alkylierende Substanz, Busulfan, führt zu einer fibrösen Endokarditis (Lit. 53 ).
- Bleomycin, ebenfalls ein Antibiotika-Zytostatikum, hat in hohen, aber klinisch relevanten Dosierungen eine Fibrosierung der Lunge mit konsekutiver Druckerhöhung im Pulmonalkreislauf zur Folge (Lit.43 ).
- Orthostatische Hypotonie und Myokardinfarkt sind beschriebene, sehr seltene Nebenwirkungen von Vincristin, einem Vinca-Alkaloid (Lit.30, 102).
- Ähnlich den Anthracyclinen und Cyclophosphamid ist für 5-Fluoruracil - einen Antimetaboliten, eine toxische Myokarditis beschrieben (Lit.20)

Aus der bisherigen Erfahrung im therapeutischen Umgang mit Adriamycin lassen sich die folgenden drei Regeln zur Verminderung der kardiotoxischen Nebenwirkungen ableiten:

1. Langsame Applikation und niedrige Einzeldosis von Adriamycin (Lit. 127, 94, 37, 39, 161).
2. Überschreiten der Grenzdosis von  $550 \text{ mg/m}^2$  nur unter engmaschiger kardiologischer Kontrolle (Lit. 76).
3. Besondere Vorsicht bei zusätzlichen Risikofaktoren (fortgeschrittene Herzkrankheiten (Lit. 38), schlechter Allgemeinzustand (Lit. 76), vorherige Bestrahlung des Mediastinums oder Therapie mit Cyclophosphamid (Lit. 107), Alter unter 15 oder über 60 Jahre (Lit. 157)).

Die Therapie der Adriamycin-Kardiomyopathie im fortgeschrittenen Stadium ist nicht sehr erfolgversprechend (Lit. 76). Sie wird mit Digitalis, Diuretika und eventuell auch Katecholaminen und Vasodilantien versucht (Lit. 100, 125, 132, 76). Kardioprotektive Substanzen haben sich bisher nicht sicher bewährt (Lit. 76).

#### 1.4. Derzeitige Arbeitshypothesen zur Pathogenese der Adriamycin-Kardiotoxizität

Die Pathogenese der Adriamycin-Kardiotoxizität ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch immer nicht geklärt.

Folgende Hypothesen für die Entstehung der Adriamycin-Kardiotoxizität werden diskutiert:

##### - Wirkung auf die Synthese der Nukleinsäuren

Die ersten Arbeiten zur Pathogenese der Adriamycin-Kardiomyopathie gingen vom Effekt an der Tumorzelle aus und untersuchten und fanden auch an der Herzmuskelzelle eine Störung der DNA-Synthese (Lit. 121, 133). Als Einwand kann gelten, daß nach den ersten Lebenswochen keine DNA-Synthese in der Herzmuskelzelle mehr stattfindet (Lit. 171). Arena et al. (Lit. 4) berichteten über eine Hemmung der Transkription und Abnahme der Protein-Synthese der Herzmuskelzelle. Auch Zähringer et al. (Lit. 169, 170) vermuteten eine Interaktion von Adriamycin mit der DNA und fanden eine Abnahme der myocardialen

RNA und der Polyribosomen, die sich auf den myocardialen Proteinturnover auswirkt. Nach Ferrans (Lit. 56 ) beträgt die Halbwertszeit für kontraktile Proteine in der Herzmuskelzelle etwa ein bis zwei Wochen. Die Ergebnisse zur Wirkung von Adriamycin auf die Nukleinsäuren und den myocardialen Proteinturnover können somit nur die chronische Kardiotoxizität, nicht aber die akuten kardiotoxischen Nebenwirkungen erklären.

- Freisetzung vasoaktiver Substanzen durch Adriamycin

Bristow et al. (Lit. 23 ) und Herman et al. (Lit. 74 ) betrachten die Freisetzung von Histamin, Katecholaminen und Prostaglandinen nach Adriamycin-Gabe als Ursache der akuten und chronischen Adriamycin-Kardiotoxizität. Die Freisetzung von Histamin wird dabei als eine Adriamycin-Wirkung angesehen, der Anstieg der Katecholamin-Konzentration vor allem als eine Histamin-Wirkung auf das Nebennierenmark (Lit. 22 ). Weitere Beobachtungen zeigen aber auch eine direkt durch Adriamycin gesteuerte Freisetzung von Katecholaminen (nach Blockade der  $H_1$ - und  $H_2$ -Rezeptoren) (Lit. 22). Nach Bristow et al. (Lit. 24) und Ohuchi et Levine (Lit. 117) aktiviert Adriamycin die Synthese von Prostaglandinen am Myokard und den Nieren. Bristow et al. zeigten, daß eine Blockade der  $H_1$ - und  $H_2$ -Rezeptoren am chronischen Kaninchen-Modell durch Diphenhydramin, Cimetidin und Phentolamin die Tiere teilweise vor den kardiotoxischen Nebenwirkungen schützt (Lit. 23).

- Hemmung von Koenzym  $Q_{10}$

Iwamoto et al. (Lit. 78) postulierten aufgrund der Quinon-Struktur von Adriamycin und des einzigen natürlichen im Körper vorhandenen Quinons, Koenzym  $Q_{10}$ , eine Wechselwirkung zwischen beiden. Tatsächlich fanden sie eine Hemmung von Koenzym  $Q_{10}$ -abhängigen Systemen durch Adriamycin. Es wurde auch von einem protektiven Effekt von Koenzym  $Q_{10}$  gegenüber dem Schweregrad der Adriamycin-Kardiomyopathie berichtet (Lit. 18 ). In vitro Experimente mit dem Langendorff-Präparat ergaben nach Zugabe von Koenzym  $Q_{10}$  in die Perfusionslösung eine längere Überlebenszeit der Herzen. Auch die Abnahme des Herzgewichts bei mit Adriamycin behandelten Mäusen konnte durch Koenzym  $Q_{10}$  verhindert werden. Dieser protektive Effekt sollte durch die Gabe von Verapamil noch verstärkt werden können. Bristow (Lit. 24 ) und Young et al. (Lit. 168 ) konnten diese Wirkung von Koenzym  $Q_{10}$  und Verapamil in Langzeitstudien allerdings nicht nachvollziehen.

## - Die Bildung freier Radikale

Zytostatika, die Quinon-Strukturen enthalten, können nach Handa et Sato (Lit. 67) als freie Radikale wirken. Bachur et al. (Lit. 12) zeigten, daß Adriamycin an der Ratte in den Mikrosomen von Leber und Herz den Elektronenfluß von NADPH auf molekularen Sauerstoff steigert und somit Superoxide bilden kann. Nach Myers (Lit. 112) kann die Bildung von Superoxyden zur Peroxidation von Membranlipiden führen. Dieser Oxidation von ungesättigten Fettsäuren der Membran wird ein maßgeblicher Effekt in der Pathogenese der Adriamycin-Kardiomyopathie zugesprochen (Lit. 87, 48, 139). Es wurde gefunden, daß durch alpha-Tocopherol (Vitamin E) diese durch die Anthracycline verursachte Steigerung der Bildung von Superoxyden gehemmt wurde. Die Wirkung von alpha-Tocopherol zeigte auch an der Maus eine Verlängerung der Überlebensrate, verbunden mit einer langsameren Abnahme des Herzgewichtes, einer typischen Nebenwirkung von Adriamycin bei Mäusen (Lit. 111). Da weder hämodynamische noch muskelmechanische Messungen durchgeführt wurden, ist nicht schlüssig bewiesen, daß alpha-Tocopherol den spezifisch-kardiotoxischen Mechanismus unterbricht. Auch konnte Bristow (Lit. 24) diesen von Myers beschriebenen Effekt von alpha-Tocopherol nicht bestätigen. Van Fleet und Ferrans (Lit. 154) kamen ebenfalls zu dem Resultat, daß Vitamin E oder Selenium keine kardioprotektive Wirkung haben. Darüber hinaus würde nach Ferrans (Lit. 55) die lange Latenz zwischen der Gabe von Adriamycin und der Ausprägung des Herzversagens eine Erklärung der Adriamycin-Kardiotoxizität alleine durch die Lipid-Peroxidation nicht wahrscheinlich erscheinen lassen.

## - Adriamycin-Kalzium-Interaktion

Olson (Lit. 118), Jaehnke (Lit. 79) und Bühner (Lit. 25) beschreiben einen  $\text{Ca}^{++}$ - "Overload" der Herzmuskelzelle nach Adriamycin-Behandlung. Es gibt mehrere Arbeiten über die Wechselwirkung zwischen Adriamycin und den Systemen, welche die Kalzium-Konzentration und den Kalzium-Transport regulieren:

- o Olson beschrieb neben dem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration auch eine Erhöhung der intrazellulären Natrium- und  $\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration (Kaninchen, 200 - 400 mg Adriamycin/ $\text{m}^2$ ) (Lit. 118).
- o Bühner et al. (Lit. 25) führen die Erhöhung des frei ionisierten Kalzium auf eine verminderte Rückresorption des Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien (Herzmuskelzellkulturen von Hühnerembryonen, 5  $\mu\text{g}$  Adriamycin/ml) zurück.

- o Elektronenoptische Untersuchungen haben ergeben, daß Mitochondrien nach Adriamycin-Therapie verdickt sind und intramitochondriale Einschlüsse aufweisen, die als Kalziumphosphat identifiziert wurden (Lit. 167, 134, 98).
- o Einen hemmenden Effekt von Adriamycin auf den Kalzium-Transport von Mitochondrien des Herzens (Ratte,  $10^{-5}$  M bis  $10^{-4}$  M Adriamycin) beschrieb Moore (Lit. 108). Anghileri berichtete über eine Störung der Kalzium-Aufnahme an Mitochondrien von Ehrlich Ascites Tumorzellen (Maus, 5 - 50 µg Adriamycin/ml) und an einem biphasischen Membranmodell (Lit. 3).
- o Auch Bachmann et al. (Lit. 8) fanden eine Hemmung der Kalzium-Aufnahme durch die Mitochondrien (Ratte,  $10^{-4}$  M Adriamycin) und eine Hemmung der Elektronenübertragung in der Atmungskette. Revis (Lit. 131) kommt beim Kaninchen bei einer Konzentration von 13,5 mg Adriamycin/kg zu einem analogen Ergebnis und bemerkt darüber hinaus eine besondere Sensibilität von Herzmuskel-Mitochondrien im Gegensatz zu Mitochondrien von anderen Geweben.
- o Die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$  des sarkoplasmatischen Retikulums der Herzmuskelzelle (Ratte,  $10^{-5}$  M bis  $10^{-4}$  M Adriamycin) wurde von Moore (Lit. 108) untersucht. Es ergab sich keine signifikante Hemmung des Kalzium-Transports.
- o Daniels et al. (Lit. 41) berichteten über eine den Schweregrad der Kardiomyopathie abschwächenden Wirkung von Verapamil beim Kaninchen (1,0 mg Adriamycin/kg). Dieser Befund deckt sich mit der von Azuma (Lit. 7) gezeigten Stimulation des slow-calcium-channel bei niedrigerer Adriamycin-Konzentration (Herzen von Hühnerembryonen, 0,01 mg-0,05 mg Adriamycin/ml) mit nachfolgender erhöhter Kalzium-Konzentration intrazellulär.
- o Von einer Adriamycin-Kalzium-Interaktion ausgehend, kamen Höfling et al. (Lit. 75) zu folgenden Resultaten: Adriamycin bewirkt in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M bis  $10^{-6}$  M am isolierten Myokard (isometrisch kontrahierende Papillarmuskel) von Ratte und Meerschweinchen eine negativ inotrope Wirkung. Durch Erhöhung der Kalzium-Konzentration im Inkubationsmedium kann die Adriamycin-Wirkung abgeschwächt werden. Hämodynamische Parameter wie linksventrikulärer Druck, arterieller Druck und Herzminutenvolumen nehmen an thorakotomierten, instrumentierten Ratten und Hunden nach Injektion von Adriamycin dosisabhängig

ab (Ratte: 2,5 mg - 30 mg Adriamycin/kg; Hund: 0,3 mg - 5 mg Adriamycin/kg). Das ionisierte Serum-Kalzium fällt nach Adriamycin-Gabe auf etwa 25 % des Ausgangswertes ab. Die hämodynamische Akutwirkung kann durch Kalzium antagonisiert werden.

- o Einander widersprechende Befunde gibt es bezüglich der Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase des Sarkolemm. So fanden Gosalvez et al. (Lit. 66) eine Hemmung dieses Enzyms bei extrem niedrigen Konzentrationen (Kaninchen  $10^{-11}$  M Adriamycin). Solomonson et al. (Lit. 138) konnten dieses Ergebnis nicht reproduzieren (Ratte, Kaninchen, Hund, Affe). Auch Erdmann (unveröffentlichte Untersuchungen) fand keinen Anhalt für eine Hemmung der  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase durch Adriamycin in biologisch relevanten Konzentrationen.
- o Versuche von Caroni und Carafoli (Lit. 33) mit dem Natrium-Kalzium-Austausch des Sarkolemm ergaben starke Hemmungen in physiologischen Konzentrationsbereichen (Hund, 10  $\mu\text{M}$  Adriamycin). Im gleichen Sinne sprechen Ergebnisse von Villani et al (Lit. 155) und Dasdia et al. (Lit. 42). Villani fand eine starke Reduktion des austauschbaren Kalziums an isolierten Vorhöfen des Meerschweinchens (10  $\mu\text{g}$  Adriamycin/ml). Vor allem zeigte sich eine Hemmung des schnell austauschbaren Kalziums, während der langsam austauschbare Anteil leicht gesteigert wurde. Dasdia et al. untersuchten den Einfluß von Adriamycin auf spontan schlagende Herzmuskel-Zellkulturen ( $10^{-7}$  M Adriamycin) und wiesen eine Reduktion des austauschbaren intrazellulären Kalzium nach.
- o Auch Versuche mit Calmodulin, dem Mediatorprotein zellulärer Kalziumwirkungen, ergaben Hemmungen dieser Calmodulin-abhängigen Systeme. Katoh et al. (Lit. 83) konnten zeigen, daß mindestens drei im Zytoplasma der Herzmuskelzelle vorkommende Proteine, die in Calmodulin-abhängiger Weise und in Anwesenheit von Kalzium phosphoryliert werden, in Gegenwart von Adriamycin (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) nicht mehr phosphoryliert werden können. Weitere Phosphorylierungs-Reaktionen von endogenen Substraten des Herzmuskel-Cytosols, die Calmodulin-sensibel und Kalzium-abhängig sind, werden ebenfalls durch Adriamycin gehemmt (Lit. 83).

Von den potentiell möglichen kardiotoxischen Mechanismen könnte am ehesten eine Beeinflussung der Kalzium-Transportvorgänge durch Adriamycin für die Entstehung der akuten und chronischen Adriamycin-Kardiotoxizität von Bedeutung sein.

## 1.5. Zelluläre Mechanismen des $\text{Ca}^{++}$ -Transports

### 1.5.1. Sarkolemm

Die Zellwand der Herzmuskelzelle besteht aus zwei Schichten:

- a) der etwa 8 - 9  $\mu\text{m}$  dicken Plasma-Membran,
- b) der Glykokalix (bestehend aus einer ca. 20  $\mu\text{m}$  dicken inneren und einer ca. 30  $\mu\text{m}$  dicken äußeren Zone) (Lit.114, 92).

Etwa 20 % der Plasmamembran stülpt sich in Form des T-Systems in das Innere der Zelle (Lit. 77 ). Die Plasmamembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht und einem Proteinanteil, der über 50 % ausmacht (Lit. 77).

Die Plasmamembran ist für die Aufrechterhaltung einer Kalzium-Konzentration von  $10^{-7}$  M während der Diastole und für die schnelle Erhöhung der Kalzium-Konzentration auf  $10^{-5}$  M in der Systole verantwortlich (Lit.120).

In der Plasmamembran befinden sich die meisten direkt die elektromechanische Kopplung beeinflussenden Systeme:

1. Die  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase (Lit.145, 136, 52), die energieabhängig Natrium und Kalium transportiert und spezifisch durch Herzglykoside hemmbar ist.
2. Der postulierte  $\beta$ -Rezeptor mit Wirkung auf die Adenylat-Cyclase (Lit. 6, 89).
3. Die Adenylat-Cyclase (Lit.144, 50) spaltet in Anwesenheit von Magnesium ATP in c-AMP und anorganisches Pyrophosphat.
4. Die Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase (Lit. 26), welche die Hydrolyse von c-AMP katalysiert und damit die Wirkung von c-AMP beendet.
5. Der slow  $\text{Ca}^{++}$ -Channel (Lit. 14, 115, 146): Reuter und Trautwein (Lit. 128,152) konnten zeigen, daß der Kalzium-Einstrom in die Herzmuskelzelle vorwiegend während der Plateau-Phase des Aktionspotentials stattfindet. Voltage-Clamp-Versuche ergaben, daß der Einstrom in zwei Phasen abläuft:
  - a) einem starken, initialen Strom, der innerhalb von 5 msec beendet ist,
  - b) einem langsameren und schwächeren Einstrom (Lit. 129),

Katecholamine steigern die Flußrate des langsamen Kanals beträchtlich (Lit.128). Diese Katecholamin-Wirkung kann auch alleine durch c-AMP erzeugt werden (Lit. 153). Der Kanal wird durch Verapamil und D-600 gehemmt (Lit. 59), ist aber durch Tetrodotoxin, welches den einwärts gerichteten schnellen Natrium-Strom vollständig unterdrückt (Lit.129), nicht beeinflussbar (Lit. 45).

6. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch (Lit. 90,127) ist für den unter 5. erwähnten, starken, initialen Kalzium-Einstrom verantwortlich (Lit.92).

Bisher ist noch nicht völlig geklärt, ob dieser "Antiporter" elektroneutral (2 Natrium-Ionen für 1 Kalzium-Ion) oder elektrogen (3 Natrium-Ionen gegen 1 Kalzium-Ion) arbeitet und in welche Richtung (einwärts, auswärts oder wechselnd) der Austausch stattfindet (Lit.130). Vieles deutet darauf hin, daß es sich um eine 3 : 1 Stoichiometrie handelt (Lit. 130, 122, 31), die einen Transport in beide Richtungen erlauben würde, d.h. einen Austausch des durch die schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle in das Zellinnere gelangten Natrium gegen extrazelluläres Kalzium während der Depolarisation und einen Austausch von extrazellulärem Natrium gegen intrazelluläres Kalzium in der Repolarisationsphase (Lit.110). In anderen erregbaren Membranen (z.B. Axon) ist dieser Mechanismus in der beschriebenen Form bereits belegt (Lit. 13).

Carafoli et. al. (Lit. 126) konnten zeigen, daß ähnlich der Axon-Membran der Austausch des Sarkolemm durch niedrige ATP-Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) stimulierbar ist. Der einzige bisher bekannte spezifische Hemmstoff dieses Austausch ist Adriamycin (Lit. 33).

7. Eine  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase wurde gleichzeitig von Dietze (Lit. 46) und Dhalla (Lit. 143) beschrieben, konnte aber erst durch Verwendung einer nur gering mit den anderen Zellorganellen (SR, Mitochondrien) kontaminierten Vesikel-Präparation bewiesen und charakterisiert werden (Lit. 32).

Diese ATPase transportiert Kalzium-Ionen in den Extrazellulärraum. Im Vergleich mit dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch des Sarkolemm fällt sowohl eine höhere  $K_M$  (Affinität) zu Kalzium als auch eine niedrigere  $V_{\text{max}}$  (maximale Geschwindigkeit) für Kalzium auf (Lit. 34).

Die  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -ATPase des Sarkolemm könnte somit für die Feinregulierung des intrazellulären Kalzium-Gehaltes während der Repolarisation zuständig sein (Lit. 34). Von der  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -ATPase des SR kann sie durch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit gegenüber Vanadat unterschieden werden (Lit. 34).

Die  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -ATPase des Sarkolemm ist Calmodulin-abhängig. Dieser Effekt konnte bereits für eine Isolierung durch Calmodulin-Affinitätschromatographie ausgenutzt werden (Lit. 34).

### 1.5.2. Sarkoplasmatisches Retikulum

Das sarkoplasmatische Retikulum durchzieht die Herzmuskelzelle in Form eines dreidimensionalen Netzwerks innerhalb eines Sarkomers mit dichtem Kontakt zu den Myofibrillen und dem T-System des Sarkolemm (Lit. 104). Es stellt damit eine intrazelluläre Organelle dar (Lit. 113), die zu über 60 % aus Proteinen besteht (Lit. 72). Der Lipidanteil (ca. 35 % der Masse) setzt sich vorwiegend aus Phospholipiden mit hohem Anteil an ungesättigten Fettsäuren zusammen (Lit. 103).

Die Funktion des SR ist die rasche Aufnahme von intrazellulärem Kalzium um die Relaxation zu ermöglichen. Dies ist die einzige bisher bekannte Aufgabe des SR der Herzmuskelzelle (Lit. 72). Der Transport des Kalzium in das Innere des SR wird durch die von Hasselbach (Lit. 70) erstmals beschriebene  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase, ein integrales Membranprotein des SR durchgeführt (Lit. 72). Dieses Protein mit einem Molgewicht von 100.000 Dalton (Lit. 148) macht ca. 50 % des Proteinanteils von myocardialem SR aus (Lit. 148). Die Primärstruktur dieser ATPase des SR ist im Falle des Skelettmuskels bereits bekannt (Lit. 1). Elektronenmikroskopische Studien ergeben einen Durchmesser des Proteins von 90 Angström (Lit. 119).

Die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase arbeitet mit einem Transport-Energie-Verhältnis von 2 : 1, d.h. 2 Kalzium-Ionen werden durch die Spaltung eines ATP-Moleküls transportiert (Lit. 72). Typische Eigenschaften dieser Transport-ATPase sind ihre Hemmbarkeit durch Vanadat (Lit. 159) und die Stimulierbarkeit der Kalzium-Aufnahme in die Vesikel des SR durch Oxalat (Lit. 71).

Katz et al. (Lit. 85) konnten zeigen, daß der Kalzium-Transport durch zwei Systeme moduliert werden kann:

1. Durch eine c-AMP-abhängige Phosphorylierung: die katalytische Untereinheit von c-AMP-abhängiger Proteinkinase katalysiert direkt die Anlagerung von Phosphat an Phospholamban, einem weiteren SR-Protein, an einer der beiden Bindungsstellen des Phospholambans. Dieser Prozeß ist nicht Kalzium-abhängig. Die ATPase-Aktivität nimmt zu. Diese Wirkung von c-AMP erklärt die Beschleunigung der Relaxation durch Katecholamine (Lit. 97)
2. Durch Calmodulin: Calmodulin bindet Kalzium, ändert seine Konformation und verbindet sich mit einer membranständigen Proteinkinase, welche ihre Konformation ändert und die Anlagerung von Phosphat an der zweiten Bindungsstelle des Phospholamban katalysiert. Diese Reaktion ist kalziumabhängig. Durch Versuche mit ( $^{125}\text{I}$ )-Calmodulin konnte gezeigt werden, daß in der SR-Membran Calmodulin-Bindungsstellen sind. Die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$  wird ebenfalls gesteigert (Lit. 97).

### 1.5.3. Mitochondrien

Mit einem Durchmesser von ca.  $0.5\ \mu$  und einer Länge von bis zu  $2\ \mu$  gehören die Mitochondrien zu den größten Organellen im Cytosol. Mitochondrien besitzen zwei elektronenmikroskopisch unterscheidbare Membranstrukturen:

1. Die Außenmembran, die permeabel für Stoffe bis zu einem Molekulargewicht von etwa 3.000 ist (Lit. 88).
2. Die Innenmembran, die weitgehend impermeabel ist, sich in Form der Cristae in die Matrix erstreckt und die Enzyme für die oxydative Phosphorylierung und für den Substratabbau enthält (Lit. 88).

Der Kalzium-Transport durch die innere Mitochondrienmembran wird durch einen "Uniporter" und einen "Antiporter" geregelt (Lit.40,58)

- a) Der "Uniporter" ist für die energieabhängige Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien verantwortlich, die durch das Membranpotential ermöglicht wird, welches durch den Elektronentransport oder durch die Spaltung von endogenem mitochondrialen ATP aufgebaut wird (jedes  $\text{Ca}^{++}$  trägt zwei positive Ladungen, die durch den Ausstoß von 2 Protonen ausgeglichen werden). Die Kalziumaufnahme durch die Spaltung von endogenem ATP stellt dabei den zuerst einsetzenden Mechanismus dar, der zudem eine höhere Umsatzrate als die nachfolgende Kalziumaufnahme über den Elektronentransport hat (Lit. 96). Hemmstoffe der Kalziumaufnahme sind damit sowohl Inhibitoren des Elektronentransports der Atmungskette (z.B. Rotenone) (Lit.140), als auch Hemmstoffe des terminalen Phosphattransfers (Oligomycin) (Lit. 140).
- b) Die Abgabe von Kalzium durch die Herzmuskel-Mitochondrien erfolgt nach Carafoli (Lit. 29) durch einen elektrogenen "Antiporter", der  $1\text{Ca}^{++}$  gegen  $3\text{Na}^{+}$  austauscht.

Neben dem offenbar für Herzmuskelmitochondrien typischem  $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$ -Austausch, der einen Zusammenhang mit dem schnellen  $\text{Na}^{+}$ -Einstrom während der Depolarisation nahelegt, gibt es noch ein weiteres Argument, welches für eine maßgebliche Beteiligung des in den Mitochondrien gespeicherten Kalzium an der elektromechanischen Kopplung spricht (Lit. 28, 95): Die Fläche der inneren Mitochondrienmembran macht nach Scarpa und Graziotti (Lit. 135) 86 % gegenüber 12 % des sarkoplasmatischen Retikulums (Lit.137) und etwa 1 % des Sarkolemm (Lit.163) aus.

Bei diesen Zahlen muß aber berücksichtigt werden, daß die Kalzium-Transport-ATPase des SR etwa 50 % des gesamten Proteingehaltes des SR darstellt, der "Uniporter" und "Antiporter" der inneren Mitochondrienmembran dagegen nur einen kleinen Teil der Membranproteine der Mitochondrieninnenmembran ausmachen (Lit.68, 84).

#### 1.5.4. Calmodulin

Calmodulin ist ein hitzebeständiges Protein (bis 100°C) mit einem Molekulargewicht von 16.700 (Lit. 36). Es besitzt 4 Bindungsstellen für Kalzium und Magnesium (Lit. 164), wobei die Affinität zu Kalzium höher ist als die zu Magnesium. In der Herzmuskelzelle liegt Calmodulin in der Ruhephase als  $Mg_4$ -Calmodulin-Komplex vor. Wenn sich die intrazelluläre Kalzium-Konzentration erhöht, bildet sich die aktive Form, der  $Ca_3Mg_1$ -Calmodulin-Komplex (Lit. 158). Durch die Kalziumbindung ändert das Calmodulin seine Konformation in eine Alpha-Helix. Der Kalzium-Calmodulin-Komplex bindet an das jeweilige Apoenzym, woraus das funktionsfähige Holoenzym resultiert (Lit. 99, 149).

Calmodulin ist eines der ältesten Kalzium-bindenden Proteine mit äußerst geringer Sequenzänderung (nur konservativer Aminosäureersatz, da sonst Letalfaktor) im Lauf der Phylogenese (Lit. 36, 64).

Calmodulin kommt ubiquitär vor und gehört zu einer homologen Klasse von Kalzium-Bindungsproteinen (Lit. 36). So besteht Übereinstimmung in ca. 70 % der Aminosäuresequenz mit Troponin C, welches z.B. bei der elektromechanischen Kopplung durch Calmodulin ersetzt werden kann (Lit. 2). Sehr große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz bezüglich der Kalzium-Bindungsstellen besteht auch mit Parvalbumin (Lit. 105).

Innerhalb der Zelle greift Calmodulin in folgende Stoffwechselvorgänge ein (Lit. 105):

Nukleotid - Stoffwechsel:

Phosphodiesterase

Adenylat-Cyclase

Protein - Phosphorylierung:

Membran-Proteine

Cytoplasmatische Proteine

Myosin - light - chain - Kinase:

Herzmuskulatur

Skelettmuskel

glatte Muskulatur

Zusammenlagerung der Mikrotubuli in der Mitose

Glycogen - Stoffwechsel:

Phosphorylase Kinase

Sekretion:

Neurotransmitterfreisetzung

Andere Enzym - Systeme:

NAD<sup>+</sup>-Kinase

Tryptophan 5'-Monooxygenase

Phospholipase A<sub>2</sub>

Der modulierende Effekt von Calmodulin auf die Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>-ATPase des SR und SL wurde bereits unter 1.5.1 und 1.5.2 dargestellt.

Besonders gut erforscht ist der Einfluß von Calmodulin auf die Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>-Transport-ATPase des Erythrozyten: Calmodulin liegt als lösliches Protein im Cytoplasma des Erythrozyten vor; in Abhängigkeit von der Kalzium-Konzentration assoziiert oder dissoziiert Calmodulin von der Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>-Transport-ATPase und moduliert damit deren Transportkapazität (Lit. 156, 81).

## 2. Fragestellung

Ausgehend von den verschiedenen Befunden, die für eine Wechselwirkung zwischen Adriamycin und der intrazellulären Kalzium-Konzentration und dem Kalzium-Transport sprechen, stellten wir uns folgende gezielte Fragen:

1. Welche Wirkung zeigt Adriamycin in vitro auf biochemische Parameter des Kalzium-Transports, i.e. die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen des Sarkolemm, des sarkoplasmatischen Retikulum und der Mitochondrien?
2. Hemmt Adriamycin die für den Kalzium-Transport besonders wichtigen Calmodulin-abhängigen Systeme der Herzmuskelzelle? Als vereinfachtes Modell wurde hier die Calmodulin-abhängige  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase der Erythrozytenmembran untersucht.
3. Wirken andere Zytostatika (teilweise mit bekannter Kardiotoxizität) auf die hier getesteten Parameter des Kalzium-Transports, ähnlich wie Adriamycin, oder besitzt Adriamycin eine spezifische Wirkung?

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

( $^{45}\text{Ca}$ )- $\text{CaCl}_2$  wurde von Firma NEN bezogen. Als Szintillationslösung wurde Bioflour, ebenfalls von Firma NEN, verwendet.

Für die Ionenaustauschchromatographie benützten wir als Gel-Material Whatman DE-52, für die Gel-Filtration Ultroge $\ell$  AcA 44.

Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Firmen Merck, Sigma, Serva, Boehringer, Roth und Fluka (vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad).

Zum Ansetzen aller Lösungen wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet.

#### 3.2. Methodik

##### 3.2.1. Sarkolemm

##### 3.2.1.1. Isolation von Vesikeln des Sarkolemm (SL) durch Differential- und Gradienten-Zentrifugation

Zur Isolierung größerer und vermehrt angereicherter Mengen von Sarkolemm benützten wir eine von Caroni et al. 1980 (Lit. 31) modifizierte Methode nach Jones et al. 1979 (Lit. 82).

Die Herzen frisch geschlachteter Kälber (ca. 2 min. nach Bolzenschuß) wurden noch schlagend in eiskalter 0.75 M KCl, 20 mM Hepes-Lösung (pH=7.8) gewaschen. Nach dem Abpräparieren von Fett, Bindegewebe und größeren Koronargefäßen wurde das Gewebe mit dem Fleischwolf (Lochdurchmesser der Scheibe 4 mm) zerkleinert, in ca. 1.5 l KCl-Hepes-Lösung (s.o.) suspendiert und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator bei 11.000 r oder einem Polytron-Homogenisator (PT 20 Stellung 5.2) 5 x 5 sec. homogenisiert. Das Homogenat wurde dann 13 min. lang mit 21.500 g (Sorvall Zentrifuge, GS 3-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig

und nicht vollständig abgegossen, das Pellet in ca. 1 l KCl-Hepes-Lösung resuspendiert und 15 min. mit 21.500 g zentrifugiert. Vor dem nächsten Zentrifugationsschritt (17 min. mit 21.500g) wurde das Pellet in ca. 1 l 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM Hepes (pH=7.8) aufgelöst. Das jetzt erhaltene Pellet wurde wieder in  $\text{NaHCO}_3$ -Hepes (s.o.) resuspendiert und 4 x 30 sec. lang homogenisiert (Ultra-Turrax oder Polytron PT20). Aus dem nächsten Zentrifugationsschritt (10 min., 21.500 g) wurde der Überstand gewonnen und durch zwei Lagen mit Aqua bidest angefeuchteter ES-Kompressen filtriert. Das Pellet des nächsten Schrittes (80 min. bei 50.000 g mit Rotor T19 auf Beckman UZ LN 65) wurde in ca. 150 ml 0.2 M Saccharose, 5 mM Hepes (pH=7.2) gelöst und von Hand gründlich homogenisiert. Es folgte eine 13minütige Zentrifugation bei 21.500 g (Sorvall, GS3 Rotor) und eine nochmalige Zentrifugation des Überstandes mit 110.000 g für 50 min. (Beckman UZ, TI 60 Rotor). Der Überstand wurde verworfen, die weiße Auflagerung des Pellet durch wiederholtes, vorsichtiges Anspritzen mit einer Pasteur-Pipette abgelöst, gesammelt und zu 80 ml der folgenden Lösung gegeben: 50 mM Hepes, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.5 mM EGTA, 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , 24 mM Na-Kreatinphosphat, 100 mM KCl und nach pH-Einstellung auf 6.8 Zugabe von 0.2 mg/ml Kreatinphosphokinase.

Dieser Ansatz wurde 5 min. bei 37°C in Anwesenheit von 20 ul/ml einer 250 mM K-Oxalat-Lösung und 50 ul/ml einer 240 mM  $\text{K}_2$ -ATP-Lösung inkubiert; nach 5 min. wurden weitere 20 ul/ml der 250 mM K-Oxalat-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde nach weiteren 5 min. durch Abkühlung in Eiswasser gestoppt. Anschließend wurde 30 min. mit 150.000 g zentrifugiert (Beckman UZ, TI 60 Rotor). Das Pellet wurde mit 0.25 M Saccharose, 0.3 M KCl, 0.1 M Hepes, 50 mM  $\text{Na}_2$ -Pyro-Phosphat (pH=7.2) auf ein Gesamtvolumen von 8 ml gebracht, von Hand gründlich homogenisiert und auf einen Saccharose-Gradienten geschichtet (4.4 ml 1.5 M Saccharose unter 24 ml 0.6 M Saccharose, beide gelöst in 0.3 M KCl, 0.1 M Hepes, 50 mM  $\text{Na}_2$ -Pyro-Phosphat, pH=7.2).

Mit einem Swing-Out-Rotor wurde 130 min. bei 132.000 g zentrifugiert (Beckman UZ LN 65, SW 27 Rotor). Die über der 0.6 M Saccharose liegenden scharfe SL-Bande und die in der 0.6 M Saccharose liegende verstrichene SL-Bande ("Interphase") wurden mit Pasteur-Pipetten abgesagt, mit Aqua bidest mindestens drei- bis vierfach verdünnt und mit 150.000 g

30 min. lang zentrifugiert (Beckman UZ LN 65, Rotor TI 60). Das Pellet wurde in "Natrium-Medium" (160 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH=7.4 mit NaOH) oder "Kalium-Medium" (160 mM KCl, 20 mM Hepes, pH=7.4 mit KOH) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.1.1.1. Bestimmung der Seitenorientierung der sarkolemmalen Vesikel

Vesikel können in zwei möglichen Seitenorientierungen vorliegen (Lit. 3).

1. Inside-out Vesikel, d.h. die ehemalige Innenseite der Membran ist nun außen.
2. Right-side-out Vesikel: die Außenseite der Membran ist weiter außen.

Ein kleiner Teil der Vesikel liegt, bedingt durch Vorgänge wie Auftauen und Schockgefrieren, als undichte Vesikel vor (leaky vesicles).

Die Richtung kann als Näherungswert durch Messung der  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  Aktivität bestimmt werden. Ohne Detergens und Ionophor wird nur die Aktivität der  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  der leaky Vesikel gemessen. Nach Zugabe der Ionophoren Monensine (Austausch von  $\text{K}^{+}$  gegen  $\text{Na}^{+}$ ) und Valinomycin (Permeabilitätserhöhung für  $\text{K}^{+}$ ) ist es auch der  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  der inside-out Vesikel möglich, ATP zu spalten.

Die  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  der right-side-out Vesikel ist inaktiv, da die Membran gegenüber ATP und  $\text{Mg}^{++}$  undurchlässig ist. Die Totalaktivität der  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  wurde nach teilweiser Solubilisierung der Membran, z.B. durch SDS, bestimmt.

### 3.2.1.1.2. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>-Austausch an Vesikeln des Sarkolemm

Zur Messung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>-exchange bestimmten wir den energieunabhängigen <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup>-uptake durch SL-Vesikel, unter Benutzung einer Millipore-Methode (Lit. 32 ). Die SL-Vesikel wurden durch Lagerung in 160 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH=7.4 "Natrium-geladen". In ein Plastikröhrchen wurden 500 ul einer 160 mM KCl, 20 mM Hepes Lösung (pH=7.4), 10 ul 0.5 mM <sup>45</sup>Ca (ca. 1 Million cpm/10 ul) und 5 ul (1 uM) des in Äthanol gelösten Ionophor Valinomycin gegeben. 5 ul der "Natrium-geladenen" Vesikel wurden etwa 2 cm darüber an der Wand des Plastikröhrchens fixiert. Die Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>-Austauschreaktion wurde auf dem Rotamix gestartet (schnelles Zumischen des wandadhärenten 5 ul-Tropfens mit SL-Vesikeln).

Die Austauschreaktion wurde nach 3'', 8'', 20'', 1' und 3' durch Zugabe von 500 ul 2 mM Lanthanum (in 160 mM KCl, 20 mM Hepes) gestoppt). Ein Aliquot von 50 uL wird durch Millipore-Filter (Porengröße 0.22 ul) , filtriert und mit 500 ul Lanthanum-KCl-Hepes nachgewaschen.

Zur Ermittlung des Adriamycin-Effektes wurde die energieunabhängige Kalzium-Aufnahme in die "Natrium-geladenen" SL-Vesikel in Anwesenheit von Adriamycin ( $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  M) bestimmt.

Die Kontrolle (zur Bestimmung des membrangebundenen Kalziums) erfolgte durch 500 ul 160 mM KCl, 20 mM Hepes (pH=7.4) und 2 mM Lanthanum.

### 3.2.1.2. Isolierung von Vesikeln des Sarkolemm (SL), des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und Mitochondrien durch Gradienten-Zentrifugation

Zur Isolierung der drei subzellulären Fraktionen in einem Arbeitsgang benutzten wir eine modifizierte Methode von Kidwai et al. 1971 (Lit. 86 ), wie von Jaqua-Stewart et al. 1979 (Lit. 80) beschrieben.

Frisch entnommene Herzen von Kaninchen (unmittelbar nach cervikaler Dislokation entfernt) wurden zweimal in 0.25 M Saccharose-Lösung (pH=7.0 mit Tris) von ca. 2 - 4°C gewaschen. Etwa 5 g kleingeschnittenes

Myocardgewebe (nur vom linken Ventrikel) wurde in 20 ml einer 0.25 M Saccharose-Lösung (pH=7.0) homogenisiert (Virtis Omnimixer, Modell 45), 1 - 2 sec. bei 45.000 rpm. Das Homogenat wurde 1 min. lang bei 25 g zentrifugiert (Christ-Labofuge), der Überstand gesammelt, das Pellet erneut in 20 ml 0.25 M Saccharose gelöst und wieder 1 - 2 sec. mit 45.000 rpm homogenisiert und im Anschluß 1 min. mit 25 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt sechsmal wiederholt. Die gesammelten Überstände (lichtmikroskopisch waren die meisten Zellen aufgebrochen) wurden durch eine feuchte ES-Kompresse (entspricht 12 Lagen Nesselgewebe) filtriert. Das Filtrat wurde 30 min. bei 176.000 g zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge LN 65, TI 50 Rotor). Das erhaltene Pellet wurde in 25 ml einer 0.25 M Saccharose-Lösung (pH=7.0) aufgelöst, von Hand in einem Braun-Melsungen Potter-Gefäß homogenisiert und auf einen Saccharose-Gradienten geschichtet. Dieser Gradient wurde in 13 ml Beckman Polyallomer-Röhrchen vorbereitet und enthielt drei Saccharose Konzentrationen (4 ml 1.5 M Saccharose, darüber 3 ml 1.22 M Saccharose und 1,5 ml 1.1 M Saccharose, alle pH=7.0). Geschichtet wurde mit Hilfe eines eigens angepaßten Stempels, der sehr saubere und schnelle Trennung erlaubt. Der mit dem Homogenat (Membranen, Mitochondrien, Kerne, Fibrillen, Zelldebris) überschichtete Saccharose-Gradient wurde 90 min. lang mit 111.000 g in einem Swing-Out-Rotor zentrifugiert (Beckman UZ LN 65, SW 41 Rotor). SL, SR, Mitochondrien verdichteten sich als Banden an den jeweiligen Gradienten-Grenzen. Die Kerne, die kontraktile Proteine, inkomplett homogenisierte Gewebeanteile und Zelldebris sammelten sich als Pellet. Die SL-, SR- und Mitochondrien-Banden wurden mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die gesammelten SL-Fractionen wurden mit 0.25 M Saccharose (pH=7.0) auf ein Gesamtvolumen von 18 ml gebracht und zur weiteren Reinigung nochmals auf vier der oben angegebenen Saccharose-Gradienten geschichtet und 90 min. bei 111.000 g zentrifugiert.

Die SR-Banden wurden mit 0.25 M Saccharose (pH=7.0) auf 9 ml verdünnt, auf zwei der beschriebenen Gradienten geschichtet und ebenfalls 90 min. mit 111.000 zentrifugiert.

Die Mitochondrien wurden auf 24 ml verdünnt und bis zum letzten Zentrifugationsgang bei +4°C gelagert.

Die SL- und SR-Banden waren nach diesem Zentrifugationsschritt noch schärfer und wurden wieder mit Pasteur-Pipetten abgesaugt.

Alle erhaltenen SL-, SR- und Mitochondrienfraktionen wurden einer abschließenden Zentrifugation (176.000 g für 30 min. mit dem TI 50 Rotor) unterworfen, die jeweiligen Pellets in 0.25 M Saccharose pH=7.0 aufgelöst.

Alle Arbeiten wurden bei +4°C ausgeführt.

Die Fraktionen wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.2. Sarkoplasmatisches Retikulum

#### 3.2.2.1. Isolation von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Differential-Zentrifugation

Zur Isolierung der subzellulären Fraktion des SR benützten wir eine von Wierichs und Bader (Lit. 162) modifizierte Methode nach Suko und Hasselbach (Lit. 142). Die Herzen frisch geschlachteter Kälber wurden möglichst schnell entnommen (ca. 5 min. nach Bolzenschuß).

Hundeherzen wurden in Narkose (Dipidolor-Dauerinfusion oder Pento-barbital 30 mg/kg i.v.) nach Abklemmen der großen Gefäße rasch exzidiert. Nach sofortiger Reinigung mit kaltem Aqua bidest und kalter MOPS-Saccharose-Lösung (0.5 mM Saccharose, 10 mM MOPS, pH=7.0 mit Tris-Puffer) wurden Bindegewebe, Fett und große Koronargefäße abpräpariert. Etwa 50 g Herzgewebe wurden klein geschnitten (Kantenlänge etwa 1 cm) und in einem speziellen Mörser (mit flüssigem Stickstoff gefülltes Stahlgefäß mit Stahlstößel) möglichst fein zerstampft (t=30 - 40 min.). Das gewonnene Pulver wurde mit MOPS-Saccharose-Lösung im Verhältnis 1 : 5 aufgelöst und homogenisiert (2 - 3 strokes bei 1.500 rpm mit einem Braun-Melsungen Homogenisator, Gefäßdurchmesser 30 mm, Teflon-pestle 29,8 mm). Aus einem Zentrifugationsschritt mit 1.000 g (20 min. auf Sorvall-Zentrifuge mit SS 34 Rotor) wurde der Überstand gewonnen, das Pellet verworfen. Von der anschließenden Zentrifugation mit 15.000 g (20 min. mit SS 34 Rotor) wurde das Pellet zur Mitochondrienisolation weiterverarbeitet (s.u.), der Überstand nochmals 20 min. mit 15.000 g (Pellet verwerfen) und anschließend 45 min. mit 100.000 g (auf Beckman UZ LN 65 mit T35 Rotor) zentrifugiert. Das jetzt erhaltene Pellet wurde in 0.5 M Saccharose, 10 mM MOPS und 0.6 M KCl (pH=7.0 mit Tris) aufgelöst und nochmals bei 100.000 g über 45 min. zentrifugiert. Das Pellet des letzten Schrittes

wird in MOPS-Saccharose aufgelöst (Braun-Melsungen-Homogenisator, 1.500 rpm, 2 Strokes).

Alle Schritte fanden bei +4°C statt.

Die SR-Fraktion wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -25°C gelagert.

### 3.2.2.2. Isolation von Calmodulin-verarmten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Differential-Zentrifugation

Ausgehend von der unter 3.2.2.1. beschriebenen Präparationsmethode wurden von Hartweg (Lit. 69) folgende Veränderungen angewendet, um eine Calmodulin-arme SR-Vesikel-Präparation zu erhalten:

1. Statt MOPS-Saccharose-Lösung wurde 0.5 M Saccharose, 0.01 M MOPS, 0.5 mM  $MgCl_2$  und 0.2 mM EGTA (pH=7.0 mit Tris-Puffer) verwendet.
2. Die Grobzerkleinerung des Herzmuskelgewebes erfolgte nicht mit dem Mörser, sondern mit einem Fleischwolf (Lochdurchmesser 2 mm).
3. Ein zusätzlicher Ultrazentrifugations-Reinigungsschritt wurde eingeführt: Nach der letzten 100.000 g Zentrifugation folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 100.000 g.
4. Das Pellet des letzten Schrittes wurde in MOPS-Saccharose-Lösung aufgelöst und sofort in den entsprechenden Tests verwendet.

### 3.2.3. Mitochondrien - Isolierung durch Differential-Zentrifugation

Die Vorbereitung der Herzen (Reinigung, Entfernung von Bindegewebe, Fett und großen Gefäßen), die Zerkleinerung in flüssigem Stickstoff, die Homogenisation in MOPS-Saccharose-Lösung verläuft wie unter 3.2.2.1. beschrieben. Der Überstand einer Zentrifugation mit 1.000 g wurde mit einem weiteren Zentrifugationsschritt (15.000 g) pelletiert. Das Pellet wurde in 50 ml MOPS-Saccharose aufgelöst und 15 min. mit 10.000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 50 ml MOPS-Saccharose von Hand im Pottergefäß homogenisiert und zur weiteren Reinigung noch zweimal bei 10.000 g (jeweils 8 min.) zentrifugiert. Anschließend Suspension des Pellets in MOPS-Saccharose-Lösung und

Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Alle Schritte bei  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Die Methode war modifiziert nach Sordahl et al. (Lit. 140).

### 3.2.4. Erythrozyten-Präparation von Calmodulin-verarmten Membran-Vesikeln

Die Präparation von Calmodulin-verarmten Erythrozytenmembranen erfolgte nach Jarret und Penniston (Lit. 81), modifiziert wie von Gietzen beschrieben (Lit. 62).

20 ml menschliches Vollblut wurden zur Hemmung der Gerinnung mit 6 ml ACD (730 mg Citronensäure, 2,2 g Na-Citrat, 2,24 Glucose mit Aqua bidest ad 100 ml,  $\text{pH}=7.5$  mit Tris) gemischt. Nach 30 Minuten Kühlung bei  $4^{\circ}\text{C}$  und Zugabe von 200 ml Waschlösung (150 mM KCl, 20 mM Tris-Cl,  $\text{pH}=7.6$ , vorher für 30 min. mit  $\text{N}_2$  begast, um das durch Hämoglobin gebundene  $\text{O}_2$  zu entfernen) wurde 20 min. mit 4.000 g (T 35 Rotor, Beckman Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in der Waschlösung aufgelöst und einer erneuten Zentrifugation, wie unter den oben angegebenen Bedingungen, unterzogen. Das resultierende Pellet wurde im Verhältnis 1 : 14 Volumenteile in Hämolysepuffer (10 mM Imidazol-Cl, 0,5 mM EDTA,  $\text{pH}=7.6$ , vorher wieder begast) aufgelöst. Es folgte zur Hämolyse eine Kühlung bei  $0^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten. Während dieser Zeit wurde alle 2 Minuten kurz gemischt.

Das Pellet der folgenden Zentrifugation (30 min., 100.000 g, T 35 Rotor) wurde noch zweimal unter gleichen Bedingungen mit der Hämolyselösung gewaschen.

Das endgültige und weitgehend hämoglobinfreie Pellet war schwach rosa, wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 500 mM Saccharose, 100 mM KCl, 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM MOPS,  $\text{pH}=7.0$  gelagert (bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2.5. Calmodulin

#### 3.2.5.1. Präparation von Calmodulin

Wir verwendeten die von Gietzen (Lit. 62) modifizierte Methode nach Watterson (Lit. 160).

2 kg frisches Rinderhirn (ca. 30 min. nach Bolzenschuß) wurden in kalter ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) 0,9 % NaCl-Lösung transportiert. Nach Entfernung der Hirnhäute wurde ca. 1 kg Hirn 30 - 60 sec. in 2 l Puffer I (2 mM EDTA, 20 mM Tris-Cl,  $\text{pH}=7.5$ ) mit einem Warring-blendor homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min. mit 14.000 g (GS 3 Rotor, Sorval-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt, das Pellet nochmals bei gleichen Bedingungen wie oben homogenisiert und zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit dem der vorausgehenden Zentrifugation kombiniert und mit Ammoniumsulfat zu 55 % gesättigt bei  $\text{pH}=7.0$  (mit 5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  eingestellt). Diese Lösung wurde 30 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert und danach 30 min. mit 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in ca. 200 ml Puffer II (20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{pH}=8.5$  mit 5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) aufgelöst. Nach Zugabe von ca. 200 ml 98 % Äthanol wurde 30 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlt.

Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 14.000 g (30 min.), deren Überstand 1 : 10 mit 10 mM Imidazol-Puffer ( $\text{pH}=6.5$  mit HCl) verdünnt und nach Zugabe von 20 g Whatman DE-52 ca. 60 min. suspendiert wurde. Die Suspension wurde nach dem Durchlauf und der Verfestigung des Gels in einer Schott 17D3 Glasfritte in 200 ml 10 mM Imidazol-Puffer ( $\text{pH}=6.5$ ) aufgelöst und 30 min. entgast (Wasserstrahlpumpe).

Der gelöste Gel wurde auf eine Pharmazia C16/40 Säule gepackt. Über Nacht wurde ein Gradient von 150 mM NaCl nach 650 mM NaCl, 10 mM Imidazol ( $\text{pH}=6.5$ ) angelegt. Die gesammelten Fraktionen, die überwiegend das Calmodulin enthielten (Test durch Stimulation der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -ATPase der Erythrozyten), wurden wieder zu 55 % bei  $\text{pH}=7.0$  mit Ammoniumsulfat gesättigt. Nach 30 min. Kühlung bei  $4^{\circ}\text{C}$  folgte eine Zentrifugation (30 min., T35 Rotor, Beckman-Ultrazentrifuge) mit 14.000 g.

Der Überstand wurde zu 60 % mit Ammoniumsulfat gesättigt ( $\text{pH}=4.0$ ) und 30 min. gekühlt ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Das Pellet einer nun folgenden 14.000 g Zentrifugation (30 min.) wurde in ca. 50 ml 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{pH}=8.5$  aufgelöst. Die Suspension wurde in Spectrapor 3787-H45 Schläuchen (Firma A.H. Thomas, USA, Molecular cut-off 3500-8000) über Nacht gegen ca. 5 l 10 mM Imidazol-Puffer,  $\text{pH}=6.5$  dialysiert.

Das Dialysat wurde wieder auf eine Whatman DE52 gepackte Säule (Pharmazia (16/40)) aufgetragen.

Die Calmodulin enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und einer Fällung mit 50 % Ammoniumsulfat, pH=4.0 unterzogen. Nach 30 min. Kühlung bei 4°C wurde 30 min. mit 14.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH=8.5 aufgelöst und auf eine mit Ultrogel AcA 44 gepackte Pharmazia C26/100 Säule aufgetragen. Die Säule wurde über Nacht mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH=8.5 gewaschen.

Die Calmodulin enthaltenden Fraktionen wurden wie oben bestimmt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren, Lagerung bei -24°C.

### 3.2.5.2. Elektrophoretische Untersuchung von Calmodulin

Wir benutzten eine Gelelektrophorese zur orientierenden Untersuchung der Reinheit des isolierten Calmodulin (Lit. 116).

Durch Plastikplättchen ("spacer") wurde ein definierter Spalt zwischen zwei Glasplatten freigehalten (Vaseline-Abdichtung) und mit "running-Gel" und "stacking-Gel" (siehe Tabelle 1) gefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des "running"-Gels (20 ml) und des "stacking"-Gels (8 ml) für die Gelelektrophorese

| "running"<br>Gel (12 %) | "stacking"<br>Gel (5 %) |                                                  |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|
| 8,000 ml                | 1,300 ml                | 30 % w/v Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid          |
| 5,000 ml                | 2,000 ml                | 1,5 M Tris-Chlorid, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS, pH 8.8 |
|                         |                         | 0,5 M Tris-Chlorid, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS, pH 6.8 |
| 0,010 ml                | 0,005 ml                | N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine          |
| 3,300 ml                | 1,300 ml                | 3 % Polyacrylamid                                |
| 3,600 ml                | 3,300 ml                | Aqua bidest                                      |
| 0,100 ml                | 0,160 ml                | 10 % Ammoniumpersulfat                           |

Das eingegossene "running"-Gel wurde mit 1 : 4 verdünntem "running"-Gel-Puffer überschichtet und war nach 1 - 2 Stunden polymerisiert. Nach Abkippen des Puffers wurde "stacking"-Gel eingegossen, der Kamm eingesetzt und 60 Minuten belassen.

Nach Entfernen des Kamms wurden die Platten in das Elektrophoresegerät eingesetzt, mit Vaseline abgedichtet und beide Kammern mit folgendem Elektrodenpuffer gefüllt: 24 g Tris-Base, 115 g Glycin, 4 g SDS, 2,7 g EDTA (mit Aqua bidest auf 4 l auffüllen).

Die Probenlöcher wurden mit Elektrodenpuffer gewaschen und die Luftblasen unterhalb des Gels zur Verbesserung der Laufzeit durch eine 2 ml-Spritze mit umgebogener Kanüle entfernt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 2 Volumen-Anteile der Probe mit 1 Volumen-Anteil eines 3fach konzentrierten Probenpuffers (1,2 ml 0,5 M Natriumphosphat, pH=7,0, 6 ml Glycerol, 1,5 SDS, 30 mg Dithiothreitol, 10 mg Bromphenolblau und Aqua bidest ad 20 ml) gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die Proben wurden mit einer Hamiltonpipette (25 ml) auf den Boden der Probenlöcher aufgetragen.

Bei 50 Volt Betriebsspannung betrug die Laufzeit 7 - 8 Stunden. Die entfernte Gelfolie wurde 30 - 60 Minuten in 10 % Trichloressigsäure und 50 % Methanol fixiert, mit Aqua bidest gewaschen und für 1 - 2 Stunden in 0,25 % R250-Coomassieblue, 50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure gefärbt. Nach Waschen mit Aqua dest wurde die Gelfolie mit 20 % Methanol, 7,5 % Essigsäure entfärbt und getrocknet.

### 3.2.6. Markerenzym-Bestimmungen

#### 3.2.6.1. Glucose-6-Phosphatase

Die Glucose-6-Phosphatase wurde nach Moore (Lit.109) bestimmt: Bei 37°C reagierten ca. 5 µg der zu untersuchenden Fraktion 10 min. in folgendem Inkubationsmedium: 55 mM Trisbase, 11 mM Glucose-6-Phosphat, 11 mM Mercaptoäthanol (mit HCl auf pH=6.5). Es wurde mit einem Standard der Firma Sigma verglichen: 1 Unit Glucose-6-Phosphatase spaltete 1,0 µMol Pi Glucose-6-Phosphat pro min. bei pH=6.5 und 37°C. Phosphatbestimmung nach Fiske-Subbarow.

### 3.2.6.2. 5'Nucleotidase

Bestimmung der 5'Nucleotidase-Aktivität nach Moore (Lit.109):

Die Fraktionen (ca. 5 mg) werden bei 37°C 10 min. mit 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 55 mM Trisbase 11 mM AMP, pH=8.5 mit HCl inkubiert. Die Kontrolle erfolgte durch Standards der Firma Sigma: 1 Unit 5'Nucleotidase spaltete 1 µMol Pi aus AMP pro min. bei pH=9.0 und 37°C.

Die Phosphatbestimmung wurde nach Fiske-Subbarow durchgeführt.

### 3.2.6.3. Citrat-Synthase

Bestimmung nach der Methode von Srere (Lit.141):

Zu einem Inkubationsmedium, bestehend aus 1 mM DTNB, 1 M Tris-Cl, 10 mM Acetyl-CoA, 10 mM Oxalacetat (pH=8.1) wird 5 µg Protein gegeben. Die Aktivität nimmt bei RT über 3 min. linear zu und wird am Photometer bei 412 nm abgelesen.

### 3.2.6.4. Succinat-Cytochrom c-Reductase

Wir verwendeten die Methode von Tisdale (Lit.150):

In ein Inkubationsmedium, bestehend aus 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 100 mg BSA/ml, 10 mM Na-Succinat, wurde nach Zugabe von 1 - 5 µg der zu testenden Fraktion (gelöst in 0.88 M Saccharose mit 5 mM Na-Succinat) 1 mg Ferricytochrom c (Firma Sigma, Typ III, vom Pferd) eingespritzt. Die Reaktion wurde bei 38°C für 2 min. gegen einen Leerwert gemessen.

Die spezifische Aktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\Delta E / \text{min} / \text{mg Protein}}{18,5} = \mu\text{Mol Cytochrom c reduziert} / \text{min.} / \text{mg Protein}$$

### 3.2.6.5. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

Die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wurde nach Jones et al. (Lit.82 ) bestimmt.

Zu 5 µl der Fraktionen werden (10 x Proteinkonzentration -5)µl 20 mM Hepes, pH=7.4 und (0.7 x Proteinkonzentration)µl SDS (3 mg/ml) zugegeben. Nach 30 min. Inkubation bei RT werden 10 µl davon mit 165 µl Reaktionsmedium (3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM EGTA, 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, pH=7.5 mit Trisbase) 10 min. bei 37°C präinkubiert. Die Reaktion wird mit 10 µl 150 mM Na<sub>2</sub>ATP gestartet. Inkubationszeit 10 min.

Die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wird bestimmt als die Differenz der Aktivität ohne Digitoxigenin und der Aktivität in Anwesenheit von 2 mM Digitoxigenin (gelöst in 98 % Äthanol).

Phosphatbestimmung nach Stewart.

### 3.2.7. Inkubationsmedien

Die Aktivitäten der jeweiligen ATPasen wurden über direkte Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats gemessen.

Das Inkubationsmedium für die Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulum hatte folgende Zusammensetzung (Lit.162):

0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 140 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 10 mM MOPS, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 0,25 mM Quabain und 4 mM ATP (pH=7.0).  
0,1 mg Enzym/ml Inkubationsmedium wurde bei 37° 15 Minuten inkubiert.

Das Inkubationsmedium für die Bestimmung der mitochondrialen Ca<sup>++</sup>- und Mg<sup>++</sup>-ATPasen enthielt:

4 mM ATP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA und 0,25 mM Quabain (pH=7.0).

Kontrollansätze enthielten 5 mM NaN<sub>3</sub>. Inkubation mit 0,1 mg Enzymprotein/ml Inkubationsmedium, bei 37°C und 15 Minuten Reaktionszeit.

Das Inkubationsmedium zur Enzymaktivitätsbestimmung der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase (Lit. 63) der Erythrozytenmembran bestand aus 0,7 mg Protein, 10 mM Tris-Maleat-Puffer ( $\text{pH}=7.0$ ), 100 mM KCl, 0,1 mM Quabain, 1 mM  $\text{Na}^{+}$ -ATP, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 36  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{++}$  (als  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -EDTA-Puffer). Die Reaktion lief 8 Minuten. Die Calmodulin-Stimulation wurde mit 4  $\mu\text{g}$  Calmodulin/ml durchgeführt.

### 3.2.8. Methoden zur Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmungen erfolgten nach Fiske und Subbarow (Lit. 57), nach Post und Sen - Interferenzen durch die rote Adriamycin-Eigenfarbe wurden ausgeschaltet (Lit.123)-und nach Stewart (schnelle Mikromethode (Lit.147)).

Bei der Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow wurde die Enzymreaktion durch Zumischen (Rotamix) von 1 ml Trichloressigsäure gestoppt und anschließend 2 - 3 Minuten bei 4.000 rpm (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert. Zu 1 ml des Überstandes wurden 0,5 ml 2,5 % Molybdat- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz (0,095 g 1-Amino-2 Naphtol-Sulfonsäure, 0,575 g Natriumsulfit, 0,575 g Natriumdisulfit mit Aqua bidest ad 50 ml) und 3,3 ml Aqua bidest gegeben (Rotamix). Nach 20 Minuten wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen.

Bei der Phosphatbestimmung nach Post und Sen wurde die Reaktion mit 0,5 ml "SolP" (130 ml Perchlorsäure und Aqua bidest ad 1.000 ml) gestoppt (Rotamix). Nach Zentrifugation (3 Minuten bei 4.000 rpm, Hettich-Zentrifuge) wurde 1 ml des Überstandes mit 1 ml "Sol M" (60 mM Natriummolybdat in 2,25 M Natriumchlorid, ad 1.000 ml mit Aqua bidest) gemischt. Nach Zumischen von 3 ml Butylacetat (Rotamix) wurde 3 Minuten bei 4.000 rpm (Hettich) zentrifugiert und in einem neuen Reagenzglas 1 ml dieses Überstandes mit 2 ml "Sol I" versetzt (Sol I = 0,06 mM  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 14,4 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit Propanol-2 ad 1.000 ml). Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol konnte nach 10 Minuten die Extinktion bei 691 nm gemessen werden.

Bei der Phosphatbestimmung nach Stewart (schnelle Mikromethode) erfolgte der Reaktionsstop durch Entnahme von 25  $\mu\text{l}$  Aliquots, die zu 3 ml der

in Klammern angegebenen Lösung pipettiert wurden (0,045 % Malachitgrünhydrochlorid, 4,2 % Ammoniummolybdat, 60 % Perchlorsäure in wässriger Lösung und 3 ml verdünntes Triton X-405 (entspricht 5 ml Triton X-405 in 100 ml Wasser)). Die Extinktion konnte nach 1 min. bei 635 nm abgelesen werden.

Bei der automatischen, kontinuierlichen Phosphatbestimmung nach Arnold et al. (Lit. 5) mußten die Membranen nicht mehr entfernt werden, sondern wurden nach der Denaturierung solubilisiert.

Die Probe wurde nach dem Reaktionsstart (Reaktionszeit 8 Minuten, Start durch Enzym) kräftig gemischt und durch ein Glasröhrchen mit definierendem Durchmesser (Lit. 5) angesaugt. Die Reaktion wurde durch Zuleitung von Trichloressigsäure gestoppt, die Membranvesikel durch SDS solubilisiert.

Nacheinander wurden dann Luft, Lösung I (1.070 ml 4 % Ammoniumheptamolybdat, 360 ml Kaliumantimonoxidtartrat, 1.785 ml 5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ad 5.000 ml mit Aqua bidest) und Lösung II (100 g Ascorbinsäure, 10 ml 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ad 5.000 ml mit Aqua bidest) zugeführt.

Während der Passage von 2 Glasspiralen (zum Mischen) und einem Wasserbad (40°C) fand die Reduktion von Phosphomolybdat zu Molybdat-Blau statt. Nachdem die Luft wieder entfernt worden war, wurde in einer Spezialküvette die Extinktion bei 578 nm gemessen.

Die Anlage wurde nach jedem Versuch 2 Minuten mit einer Reinigungslösung (20 g NaOH-Plättchen und 50 ml 0.1 M EDTA ad 5.000 ml mit Aqua bidest) gespült.

### 3.2.9. Methoden zur Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Lowry (Lit. 101), die Standards waren BSA (Bovine serum albumine, Firma Roth).

Die modifizierte Proteinbestimmung nach Bensadaun und Weinstein (Lit. 17) war wegen Interferenzen zwischen bestimmten von uns verwendeten Substanzen (Saccharose, EDTA, Ammoniumsulfat, Hepes, Tris) und

Reagentien der Proteinbestimmung nach Lowry nötig.

Zu 25 µl Testfraktion, die mit Aqua dest. auf 3 ml aufgefüllt wurde, kamen 25 µl 2 % Natriumdesoxycholat-Lösung. Es wurde gemischt und 15 min. bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 24% TCA, es wurde gemischt und für 30 min. mit ca. 4.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Zum schwach sichtbaren Pellet wurden anschließend die üblichen Lowry-Lösungen gegeben.

#### 4. Ergebnisse

##### 4.1. Sarkolemm

##### 4.1.1. Reinheitsprüfung

Die SL-Vesikel-Präparation nach Jaqua-Stewart zeigte nur geringe  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität: 9  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  ( $n=6$ ). Zudem konnte durch 2 mM Digitoxigenin nur ca. 10 % der Gesamtaktivität gehemmt werden. Natriumazid dagegen hemmte ca. 80 % der gemessenen Aktivität ( $n=6$ ).

Die spezifische Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  des SL beträgt im Falle der Präparation nach Caroni et al. 134  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  ( $n=5$ ). Nach Hemmung durch 2 mM Digitoxigenin ergibt sich eine Restaktivität von ca. 21  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  ( $n=5$ ), d.h. Digitoxigenin hemmt zu 84 %.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse für die 5'Nucleotidase und die Succinat cytochrom c-Reductase.

Tabelle 2: Markerenzym-Untersuchungen an beiden sarkolemmalen Fraktionen

|                  | $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ | 5'Nucleotidase | Succinat cytochrom c-Reductase |
|------------------|----------------------------------------|----------------|--------------------------------|
| SL Jaqua-Stewart | 6.4                                    | 12.0           | 25                             |
| SL Jones/Besch   | 100                                    | 100            | 9                              |

Ergebnisse in % Aktivität der Referenzfraktionen: Im Fall der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und der 5'Nucleotidase war die SL-Präparation nach Caroni et al. die Referenzfraktion. Als Referenzfraktion der Succinat cytochrom c-Reductase wurden Mitochondrien verwendet (Präparation siehe 3.2.3.).

#### 4.1.2. Seitenorientierung der Vesikel

Durch die Messung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität kann eine quantitative Bestimmung der Seitenorientierung der Vesikel erfolgen. Es liegen 40 % der Vesikel als inside-out-Vesikel und 35 % als rightside-out-Vesikel vor. 25 % der Vesikel waren "leaky" (n=6).

#### 4.1.3. Wirkung von Adriamycin auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch des Sarkolemm

Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch wird neben der Calmodulin-stimulierten  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase der Erythrozyten von allen untersuchten Kalzium-Transportsystemen am stärksten gehemmt. Bereits bei Konzentrationen von  $5 \times 10^{-6}$  M Adriamycin beträgt die Hemmung 7 %. Bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M Adriamycin,  $5 \times 10^{-5}$  M Adriamycin und  $10^{-4}$  M Adriamycin wird der Austausch um 13 %, 35 % und 52 % reduziert.

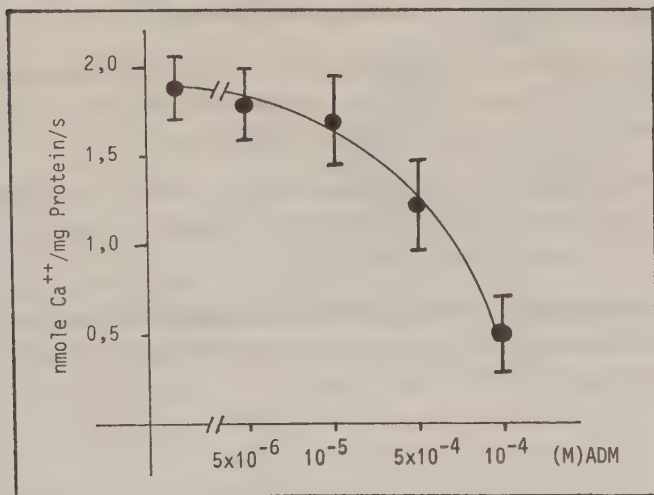


Abb. 2: Wirkung von Adriamycin auf den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch des Sarkolemm (Hund und Kalb)  
(n=6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Abszisse: Adriamycin-Konzentration (M)

Ordinate: nmole  $\text{Ca}^{++}$  aufgenommen/mg Protein/s

#### 4.1.4. Wirkung von Adriamycin auf die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase des Sarkolemm

Adriamycin hat im Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-3}$  M keine hemmende Wirkung auf die  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase des Sarkolemm ( $n=2$ ).

#### 4.2. Sarkoplasmatisches Retikulum

##### 4.2.1. Reinheitsprüfungen

##### 4.2.1.1. Kontamination durch sarkolemme Vesikel und Mitochondrien

Der Grad der Kontamination durch Mitochondrien liegt bei Messung mit dem Markerenzym für die Mitochondrien-Außenmembran (Succinat cytochrom c-Reductase) und die Matrix (Citrat-Synthase) bei 2,4 % bzw. 4,5 % ( $n=4$ , 3 verschiedene Präparationen).

Auch die Marker für Sarkolemm ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase und 5'Nucleotidase (Lit. 80)) liegen in einem extrem niedrigen Bereich von 2,0 % bzw. 4,4 % ( $n=3$ , 2 verschiedene Präparationen).

Durch Vanadat, den spezifischen Hemmstoff der  $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase wird die Aktivität bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M Vanadat um 73 % gehemmt ( $n=22$ ,  $\text{SEM}=0,94$ ).

Quabain, das fester Bestandteil des Inkubationsmediums war, hemmte die Gesamtaktivität um etwa 10 %. Auch die Hemmungen durch Natriumazid lagen im Bereich von 10 %.

#### 4.2.1.2. Elektronenoptisches Aussehen der Präparation

Die Aufnahme zeigt vorwiegend geschlossene Membranvesikel. Intakte Zellen und Mitochondrien sind nicht sichtbar. Auch kontraktile Proteine fehlen.



Abb. 3: Sarkoplasmatisches Retikulum (1 : 12.600),  
isoliert nach der modifizierten Methode von Wierichs  
et al. 1980

4.2.1.3. Verhalten der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase gegenüber Kalzium, Magnesium, Kalium, pH-Wert und ATP

Bei einer freien  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration von  $1,2 \times 10^{-5}$  M hat das Enzym den Maximalwert ( $v_{\text{max}} = 36 \mu\text{Mol Pi/mg/h}$  bei  $37^\circ\text{C}$ ) erreicht, halbmaximale Aktivierung bei einer  $[\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}]$  von  $3,2 \times 10^{-7}$  M. Die  $K_M(\text{Ca}^{++})$  liegt bei einer  $[\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}]$  von  $0,32 \mu\text{M}$ .

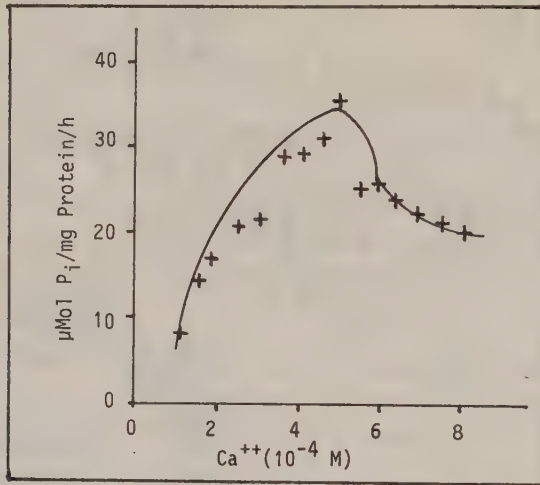


Abb. 4: Wirkung der Variation der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration auf die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR

Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase von der  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentration. Die maximale Aktivität ( $44 \mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ ) erreicht das Enzym bei einer  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentration von 6 mM. Die von uns verwendete  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentration (4 mM) ist submaximal. Jenseits des Optimums von 6 mM Magnesium ist eine inhibierende Wirkung auf die ATPase-Aktivität zu beobachten.

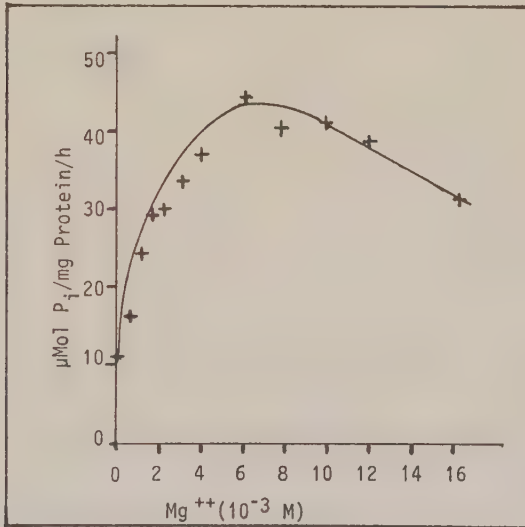


Abb. 5: Einfluß von verschiedenen  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentrationen auf die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR

Aus Abbildung 6 geht hervor, daß  $K^+$ -Konzentrationen zwischen 20 mM und 100 mM eine deutlich reduzierte spezifische Aktivität zur Folge haben. Kalium-Konzentrationen im Bereich von 120 - 140 mM haben einen stimulierenden Effekt auf die ATPase-Aktivität.

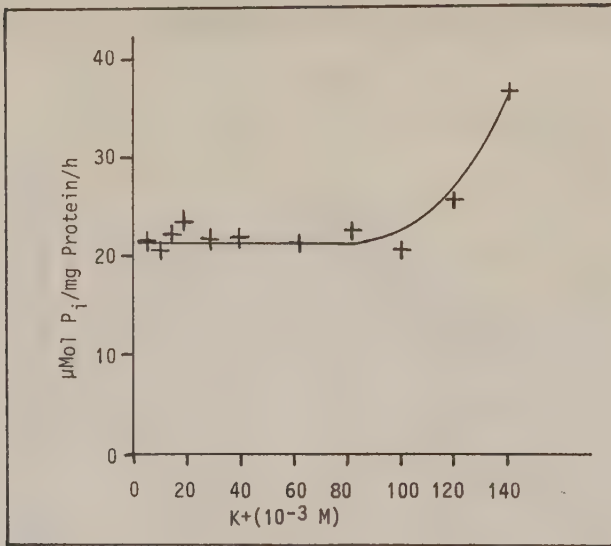


Abb. 6: Einfluß von verschiedenen  $K^+$ -Konzentrationen auf die spezifische Aktivität der  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$ -abhängigen ATPase des SR

Für den pH-Wert ergab sich für die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR ein Optimum bei  $\text{pH}=7.4$ .

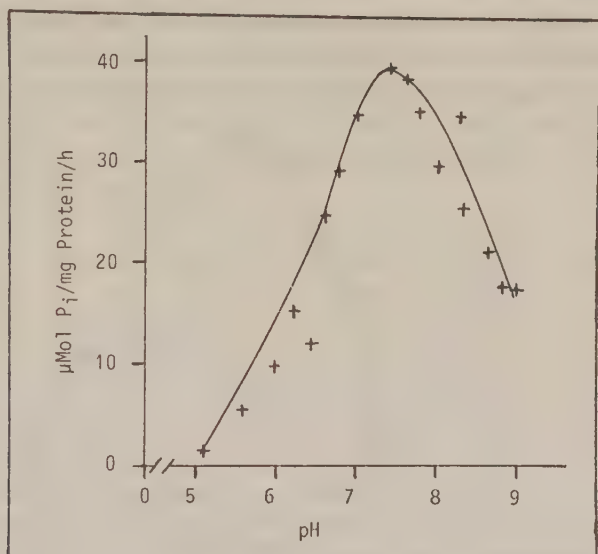


Abb. 7: Einfluß von Änderungen des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR

Mit steigender ATP-Konzentration nimmt die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase bis in den Konzentrationsbereich von 8 mM ATP zu ( $41 \mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ ).

Die  $K_M(\text{Na}_2\text{ATP})$  liegt bei  $0,9 \text{ mM Na}_2\text{ATP}$ . Wir verwendeten  $\text{Na}_2\text{ATP}$  in einer Konzentration von 4 mM.

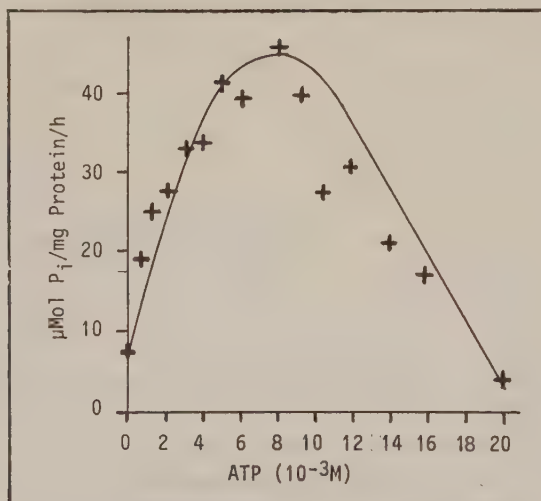


Abb. 8: Einfluß der ATP-Konzentration auf die Enzym-Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR

#### 4.2.1.4. Verhalten der Präparation gegenüber Vanadat, Natrium-Azid und Quabain

Vanadat ( $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) hemmt die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase halbmaximal ( $n=22$ , absolute Aktivität:  $17,3 \mu\text{Mol Pi/mg/h}$  bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{SEM}=1,68$ ).

Durch Zugabe von Quabain oder Digitoxigenin wurde die Gesamtaktivität um ca. 15 % ( $n=10$ ) gesenkt.

In Anwesenheit von Natriumazid nahm die Gesamtaktivität um ca. 10 % ab ( $n=20$ ).

4.2.2. Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR

Die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR vom Kalb nimmt mit steigender Adriamycin-Konzentration ab. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, beträgt die Hemmung bei einer Adriamycin-Konzentration von  $10^{-3}$  M 55 % der absoluten Aktivität. Bei geringeren Adriamycin-Konzentrationen ( $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M) betrugen die Hemmungen 13 % bzw. 4 % der absoluten Aktivität.

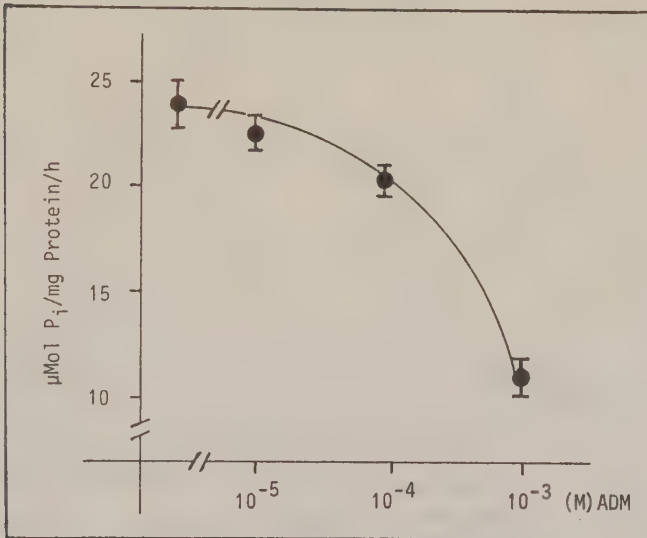


Abb. 9: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR (Kalb)  
( $n=32$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Abszisse: Adriamycin-Konzentration (M)

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat  
( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität)))

Abbildung 10 zeigt den Einfluß von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR vom Hund. Bei Konzentrationen von  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M wurden Hemmungen der absoluten Aktivität von 51 %, 14 % und 3 % gemessen. Eine Speziesdifferenz zwischen Hund und Kalb konnte somit nicht festgestellt werden.

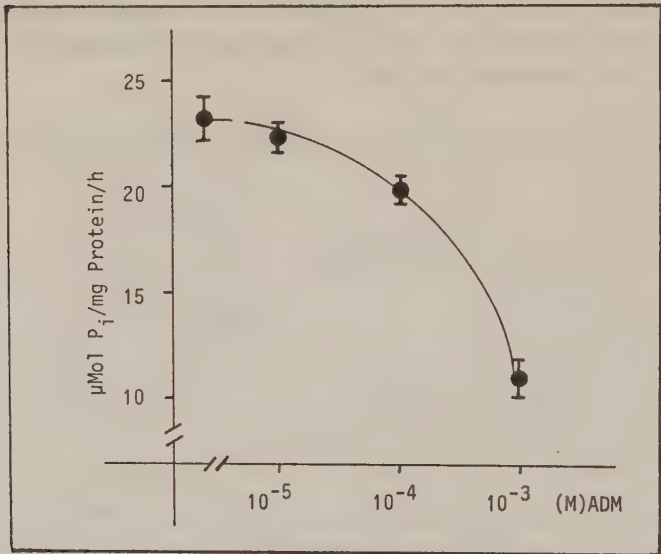


Abb.10: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR (Hund)  
( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )  
Abszisse: Adriamycin-Konzentration (M)  
Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat  
( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität)))

Adriamycinol, der Hauptmetabolit des Adriamycin, hemmt die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR (Hund und Kalb) bedeutend schwächer als Adriamycin (siehe Abb. 3).

Im Konzentrationsbereich von  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M betrugen die entsprechenden Hemmungen 25 %, 3 % bzw. 1 % der absoluten Aktivität.

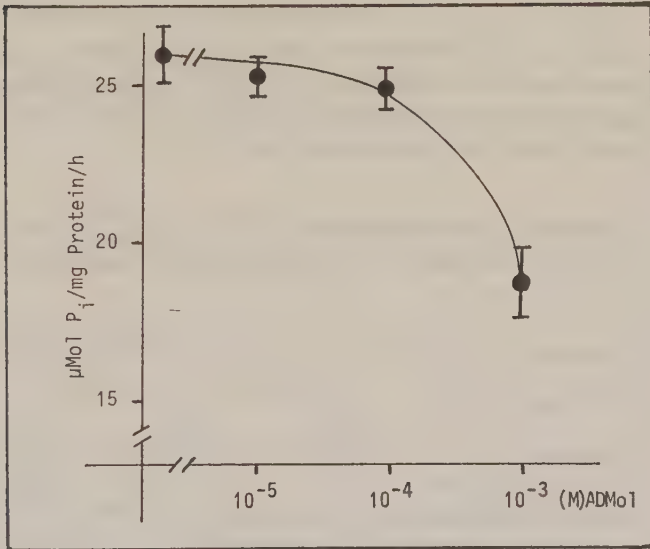


Abb. 11: Wirkung von Adriamycinol auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR (Hund und Kalb)  
( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Abszisse: Adriamycinol-Konzentration (M)

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat  
( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität)))

#### 4.2.3. Hemmung der $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR durch Adriamycin bei verschiedenen Kalzium-Konzentrationen

Im Bereich von hohen Kalzium-Konzentrationen hemmt Adriamycin die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR in stärkerem Ausmaß als bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen. Es konnte somit eine Wechselwirkung zwischen der freien Kalzium-Konzentration und der Ausprägung der hemmenden Wirkung von Adriamycin auf die ATPase-Aktivität gefunden werden. Die absoluten Aktivitäten bei  $1,3 \times 10^{-6} \text{ M}$  und  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$   $[\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}]$  entsprechen der submaximalen Aktivierung bzw. der Hemmung durch Substratüberschuß. Die Werte der prozentualen Hemmung beziehen sich auf die Ausgangswerte der absoluten Aktivitäten bei den angegebenen freien Kalzium-Konzentrationen.

Tabelle 3: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR (Kalb) bei verschiedenen Konzentrationen des freien Kalzium

| $[\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}]$                          | $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ | $1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ | $1,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| absolute Aktivität<br>( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ ) | $17,8 \pm 2,0$               | $20,3 \pm 2,7$                 | $18,9 \pm 0,32$                |
| Hemmung in %                                              |                              |                                |                                |
| ADM $10^{-3}$                                             | $66 \pm 0,42$                | $59 \pm 0,69$                  | $55 \pm 0,42$                  |
| ADM $10^{-4}$                                             | $12 \pm 0,14$                | $6 \pm 0,18$                   | $5 \pm 0,1$                    |
| ADM $10^{-5}$                                             | $3 \pm 0,1$                  | $0 \pm 0,22$                   | $0 \pm 0,18$                   |

( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

#### 4.2.4. Hemmung der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR durch Adriamycin bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen

Bei einer Konzentration von 8 mM Magnesium erreicht die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR dieser Präparationen eine spezifische Aktivität von 18,5  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ . 4 mM Magnesium stellen eine submaximale Konzentration dar, bei 12 mM Magnesium tritt bereits eine Substrathemmung durch Magnesium ein.

Die Hemmungen durch Adriamycin sind bei einer Magnesium-Konzentration von 4 mM am höchsten. Höhere Magnesium-Konzentrationen haben niedrigere Hemmungen der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR zur Folge.

Tabelle 4: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR (Kalb) bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen

| $\text{Mg}^{++}$                                      | 4 mM           | 8 mM           | 12 mM          |
|-------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Absolute Aktivität<br>$\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ | $12,1 \pm 2,6$ | $18,5 \pm 1,2$ | $12,1 \pm 0,8$ |
| Hemmung in %                                          |                |                |                |
| ADM $10^{-3}$                                         | $56 \pm 0,7$   | $43 \pm 0,3$   | $37 \pm 1,2$   |
| ADM $10^{-4}$                                         | $16 \pm 0,44$  | $7 \pm 0,26$   | $8 \pm 0,49$   |
| ADM $10^{-5}$                                         | $0 \pm 1,1$    | $0 \pm 0,1$    | $0 \pm 0,87$   |

(n=6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

4.2.5. Hemmung der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR bei unterschiedlichen Präinkubationszeiten

In Abhängigkeit von der Dauer der Präinkubation der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR mit Adriamycin und Adriamycinol nimmt die Hemmung der Aktivität deutlich zu. Jenseits von 30 Minuten Präinkubationszeit ist allerdings kaum mehr eine gesteigerte Hemmung zu beobachten.

Tabelle 5: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR bei verschiedenen Präinkubationszeiten

| Z e i t                                                   | 0 min. |       | 30 min. |       | 60 min. |       |
|-----------------------------------------------------------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|
| absolute Aktivität<br>( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ ) | 19,3   |       | 22,0    |       | 27,4    |       |
| Hemmung in %<br>$10^{-3}$                                 | 56,1   | 39,5  | 74      | 58    | 77      | 55    |
| $10^{-4}$                                                 | 3,2    | 3,0   | 18,1    | 12    | 22      | 20    |
| $10^{-5}$                                                 | 0      | 0     | 11      | 0     | 5       | 13    |
|                                                           | ADM    | ADMol | ADM     | ADMol | ADM     | ADMol |

4.2.6. Wirkung von Vinblastin, Vincristin und Endoxan auf die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR

Vinblastin hemmt die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  M zu 11 % ( $n=10$ ,  $\text{SEM}=0,21$ ). Bei niedrigeren Konzentrationen (getestet  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M) zeigt sich keine hemmende Wirkung.

Vincristin führt bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  M zu einer Hemmung von 4,3 % ( $n=12$ ,  $\text{SEM}=0,17$ ). Niedrigere Konzentrationen zeigen keinen Effekt (getestet  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M).

Endoxan bewirkt in keinem der geprüften Konzentrationsbereiche ( $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M) eine Hemmung der Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR ( $n=10$ ).

4.2.7. Aktivitätssteigerung der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR durch Calmodulin und c-AMP-abhängige Proteinkinase

Die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR wird durch Calmodulin um etwa 14 % gesteigert ( $n=10$ ,  $\text{SEM}=0,25$ ).

Auch durch c-AMP und c-AMP-abhängige Proteinkinase war eine Aktivitätssteigerung um 15 % möglich ( $n=10$ ,  $\text{SEM}=0,14$ ). Die jeweiligen Stimulationen waren nicht additiv.

#### 4.3. Mitochondrien

##### 4.3.1. Reinheitsprüfung

##### 4.3.1.1. Kontamination durch sarkolemmale Vesikel und Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulum

Untersucht wurden als Marker für das Sarkolemm die 5'Nucleotidase und für das SR die Glucose-6-Phosphatase. Die Verunreinigungen liegen nach den Ergebnissen bei etwa 15 % (n=3, 3 verschiedene Präparationen) durch SL und etwa 14 % (n=3, 3 verschiedene Präparationen) durch SR (als 100 % der Markerenzymaktivität wurde die jeweilige Fraktion eingesetzt).

Natriumazid hemmte die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase der Mitochondrien bei einer Konzentration von 10 mM zu 90 % (n=10, 5 verschiedene Präparationen).

Die Reduktion der Gesamtaktivität durch 0,25 mM Quabain lag bei etwa 5%

##### 4.3.1.2. Elektronenoptisches Aussehen der Präparation

Die Abbildung zeigt dichtgelagerte, teilweise rupturierte Mitochondrien ohne Myofibrillen oder intakte Zellen. Es sind zahlreiche Vesikel zu sehen, deren Zugehörigkeit optisch nicht differenziert werden kann.

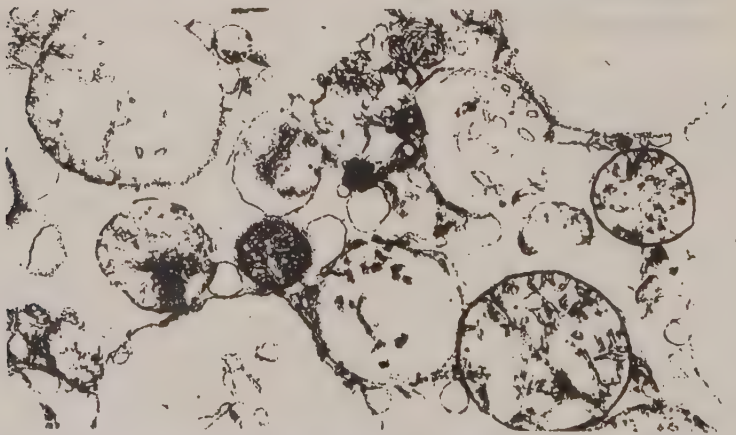


Abb. 12: Mitochondrien-Fraktion (1 : 10.300), isoliert nach der modifizierten Methode von Sordahl et al. 1971

4.3.2. Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der Mitochondrien vom Kalb

Die mitochondriale  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase vom Kalb wird von Adriamycin und Adriamycinol in gleichem Ausmaß gehemmt. Die Hemmungen betragen bei den überprüften Konzentrationen  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M Adriamycin 80 %, 23 % und 2 %. Adriamycinol bewirkt bei den erwähnten Konzentrationen eine Hemmung von 83 %, 21 % und 2 %. Ein Unterschied besteht somit nicht.

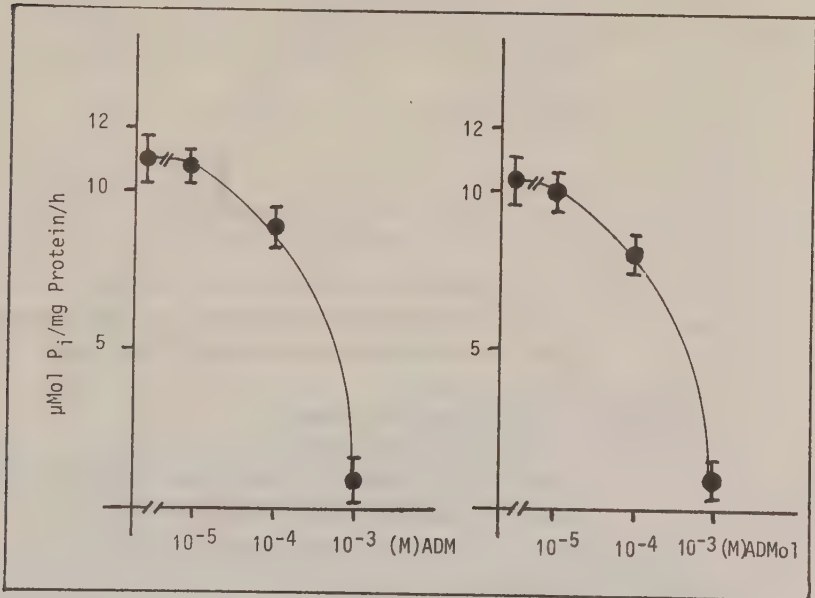


Abb. 13: Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der myocardialen Mitochondrien vom Kalb  
( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Abszisse: Konzentration von Adriamycin bzw. Adriamycinol

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat  
( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität)))

#### 4.3.3. Wirkung von Adriamycin auf die $\text{Ca}^{++}$ - und $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der Mitochondrien vom Hund

Die  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der myocardialen Mitochondrien vom Hund ist bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  M Adriamycin nur zu 53 % hemmbar. Die Hemmungen durch Adriamycin bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M Adriamycin entsprechen den Ergebnissen beim Kalb (22 % und 2 % Hemmung).

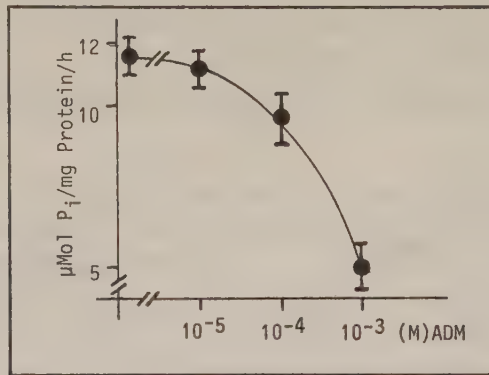


Abb. 14: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der myocardialen Mitochondrien vom Hund ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Abszisse: Adriamycin-Konzentration (M)

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat ( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität)))

#### 4.4. Erythrozyten

##### 4.4.1. Abhängigkeit der $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase von Calmodulin

Die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase ist gering im Vergleich mit den bisher beschriebenen ATPasen: zwischen 0,22 und 0,74  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ .

Nach Aktivierung durch 4  $\mu\text{g}$  Calmodulin betrug die Aktivität zwischen 1,2 und 2,38  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ . Dies entspricht einem Stimulierungsfaktor von 3,3 bis 5,4.

4.4.2. Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten mit und ohne Stimulation durch Calmodulin

Adriamycin hat im Bereich von  $10^{-4}$  M bis  $10^{-5}$  M einen sehr geringen hemmenden Effekt auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPase des Erythrozyten (2,1 % Hemmung bei  $10^{-4}$  M Adriamycin).

Bei Stimulation der ATPase durch Calmodulin treten bei Konzentrationen von  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M und  $5 \times 10^{-4}$  M Adriamycin folgende prozentuale Hemmungen auf: 20 %, 33 % und 59 %. Die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase ist  $0,45 \mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ . Der Stimulierungsfaktor war 5,2 ( $2,34 \mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ ).

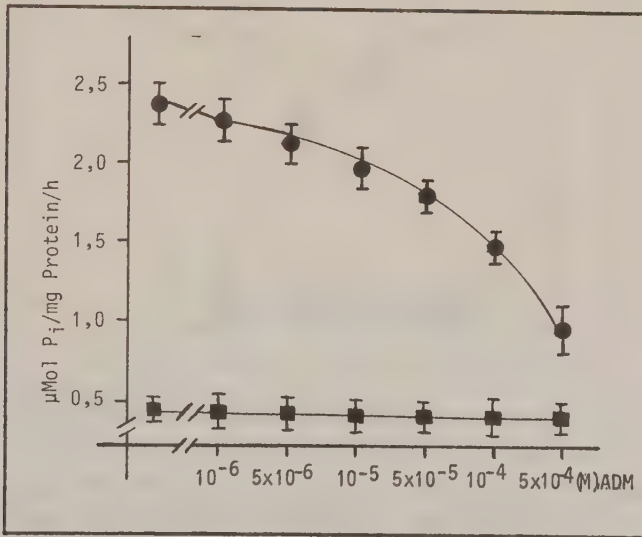


Abb. 15: Wirkung von Adriamycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten (Mensch) mit und ohne Stimulation durch Calmodulin

Abszisse: Adriamycin-Konzentration (M)

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat ( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität))

- $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )
- $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten bei Stimulation durch  $4 \mu\text{g}$  Calmodulin ( $n=7$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

4.4.3. Wirkung von Vinblastin, DTIC, Endoxan und Bleomycin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten mit und ohne Stimulation durch Calmodulin

Vinblastin, der spezifische Hemmstoff der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des Erythrozyten, hemmt die basale ATPase-Aktivität nicht. Die durch Calmodulin stimulierte ATPase-Aktivität wird bei  $10^{-6}$  M Vinblastin zu 10 %, bei  $10^{-5}$  M Vinblastin zu 28 % und bei  $10^{-4}$  M Vinblastin zu 70 % inhibiert. Die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase zeigte eine spezifische Aktivität von 0,3  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ . Der Stimulierungsfaktor war 5.3 (1,6  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$ ).

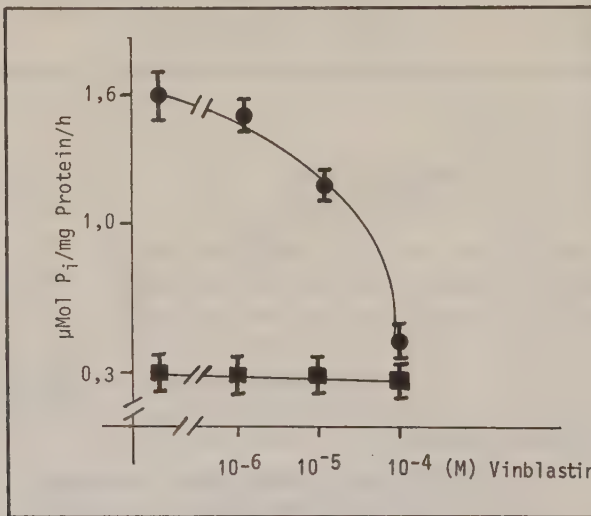


Abb. 16: Wirkung von Vinblastin auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten (Mensch) mit und ohne Stimulation durch Calmodulin

Abzisse: Konzentration von Vinblastin (M)

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat ( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität)))

■  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

●  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten bei Stimulation durch 4  $\mu\text{g}$  Calmodulin ( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

DTIC hemmt im Gegensatz zu Adriamycin und Vinblastin vor allem die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase. Bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M sind die Hemmungen 12 %, 36 % und 53 %.

Die Calmodulin-stimulierte  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase wird bei den entsprechenden Konzentrationen zu 3 %, 11 % und 27 % gehemmt. Bei einem Stimulierungsfaktor von 5.4 bedeutet dies aber keine isolierte Hemmung der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase.

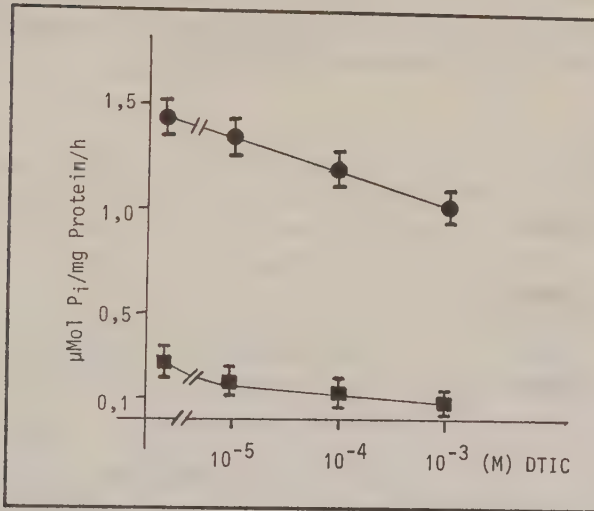


Abb. 17: Wirkung von DTIC auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten (Mensch) mit und ohne Stimulation durch Calmodulin

Abszisse: Konzentration von DTIC (M)

Ordinate: Freigesetztes anorganisches Phosphat ( $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  (= spezifische Aktivität (= Gesamtaktivität nach Abzug der Basalaktivität))

■  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

●  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten bei Stimulation durch 4  $\mu\text{g}$  Calmodulin ( $n=7$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Endoxan und Bleomycin zeigten weder eine hemmende Wirkung auf die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten, noch auf die durch Calmodulin stimulierte ATPase ( $n=2$ , getestete Konzentrationen  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M Endoxan bzw. Bleomycin).

#### 4.5. Calmodulin - Gelelektrophoretische Untersuchung

Abbildung 18 zeigt die elektrophoretische Auftrennung unserer Calmodulin-Präparation. Neben der Calmodulin-Bande, bei etwa 17.000 Dalton, ist noch eine weitere Bande bei ungefähr 16.000 Dalton sichtbar. Diese stellt eine leichte Verunreinigung des Calmodulin durch ein anderes Protein dar.

Dalton

92.000

66.000

45.000

31.000

21.000

14.000

Abb. 18: Elektrophoretische Untersuchung von Calmodulin  
Standardmolekulargewichte in Lauf 1, die Calmodulin-Fraktion in Lauf 2, 3 und 4

## 5. Besprechung der Ergebnisse

### 5.1. Sarkolemm

#### 5.1.1. Präparation und Charakterisierung der sarkolemmalen Vesikel

Wir wollten die Methode nach Jaqua-Stewart, Steffen und Reed (Lit. 80) wegen zwei entscheidender Vorteile verwenden:

1. In einem Arbeitsgang können alle drei Fraktionen isoliert werden.
2. Ein relativ geringes Ausgangsgewicht von Herzmuskelgewebe und damit die Möglichkeit, einzelne Herzen von Tieren wie Ratte und Kaninchen zu untersuchen.

Nach der Testung der Markerenzyme mußten wir aber feststellen, daß die SR-Fraktion und die mitochondriale Fraktion größere Kontaminationen als unsere Standardfraktionen aufwiesen und die sarkolemmale Fraktion über fast keine  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität verfügte (siehe Tabelle 2).

Die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  der SL-Präparation nach Jaqua-Stewart war kaum (zu 10 %) durch Quabain hemmbar. Dieses Ergebnis zeigt, daß SR- und mitochondriale Vesikel (Bruchstücke der rupturierten Mitochondrien) die SL-Fraktion ausmachen.

Wir haben uns daher entschlossen, eine neue Methode nach Jones und Besch (Lit. 82), modifiziert von Caroni und Carafoli (Lit. 31) zur Präparation der sarkolemmalen Vesikel zu benutzen.

Da wir diese Methode ohne Modifikation übernommen haben und bereits Untersuchungen (Elektronenmikroskopie, Bestimmung der Anzahl der  $\text{H}^3$ -Rezeptoren, des Neuraminidase-Gehaltes und der Aktivität der Succinat Cytochrom c-Reductase (Lit. 31,82) vorlagen, war unser Reinheitskriterium die hohe spezifische Aktivität und Hemmbarkeit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  des SL durch Digitoxigenin. Von einer  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität von 134  $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/h}$  kann auf eine ca. 100fache Anreicherung des Sarkolemm gegenüber einem Rohhomogenat geschlossen werden (Lit. 31)

Als zusätzliches wesentliches Abgrenzungskriterium gegenüber einer Vesikel-Präparation des sarkoplasmatischen Retikulum diene der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch: SL- und SR-Vesikel können Kalzium im Inneren der Vesikel akkumulieren. Nur SL-Vesikel haben jedoch bei Zugabe von Natrium die Fähigkeit, dieses gespeicherte Kalzium via einer Umkehrung der Transportrichtung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausches sofort freizusetzen (Lit. 31).

#### 5.1.2. Einfluß von Adriamycin auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch und die $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase

Das Sarkolemm besitzt zwei wesentliche Mechanismen zur Extrusion von intrazellulärem Kalzium:

1. Eine  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase,
2. den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch.

Bezüglich der Affinität für Kalzium übertrifft die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch; in der Geschwindigkeit des Kalzium-Transports übertrifft der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase etwa um den Faktor 30 (Lit. 31).

Wir konnten zeigen, daß der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch durch Adriamycin hemmbar ist (10 % bei  $10^{-5}$  M ADM). Unter klinischen Bedingungen werden Konzentrationen bis zu  $10^{-6}$  M ADM erreicht (Lit. 10).

Caroni und Carafoli (Lit. 31) konnten durch die Verwendung von Arsenazo III (Kalzium-sensitive Substanz) bei der Messung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausches die Kalzium-Bewegungen wesentlich genauer verfolgen. Sie fanden bereits bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M ADM eine Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausches von 20 %. Es ist bislang keine Substanz bekannt, die den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch stärker hemmt als Adriamycin (Lit. 33).

Der durch Adriamycin hemmbare  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch könnte sowohl für die akute als auch für die chronische Adriamycin-Kardiotoxizität bedeutsam sein: Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch bewirkt einen schnellen Kalzium-Transport entgegen einem Natrium-Gradienten. Es wird angenommen, daß der schnelle Natrium-Einstrom bei Erregung der Muskelzellmembran über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch einen schnellen Kalzium-Einstrom nach sich

zieht und damit wesentlich zur elektromechanischen Kopplung beiträgt (Lit. 31, 130). Eine Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch-Mechanismus durch Adriamycin würde also einen verzögerten und verminderten Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels nach Erregung der Zellmembran zur Folge haben. Damit würde verständlich, weshalb wir typischerweise die muskelmechanische, elektrophysiologische und hämodynamische Adriamycin-Akutwirkung als negative Inotropie bzw. als partielle elektromechanische Entkopplung beobachten. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch gilt als symmetrischer Mechanismus (Lit. 126). An der unerregten Zelle ist der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch somit am Kalzium-Auswärtstransport beteiligt. Eine Adriamycin-bedingte Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausches bedeutet folglich auch Hemmung des Kalzium-Auswärtstransports. Kann diese Hemmung nicht durch andere  $\text{Ca}^{++}$ -Transportmechanismen, wie z.B. Kalzium-ATPasen kompensiert werden, würde eine chronische intrazelluläre Kalzium-Überladung resultieren, wie sie auch nach Therapie mit Adriamycin von mehreren Autoren beschrieben ist. (Lit. 79, 118, 25).

Die  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase, die über die Regulation der intrazellulären Natrium- und Kalium-Konzentration indirekt an der intrazellulären Kalzium-Konzentration beteiligt ist, wird durch Adriamycin im von uns getesteten Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-7}$  M und  $10^{-3}$  M ADM nicht gehemmt. Zudem wurde auch von Solomonson (Lit. 138) und Erdmann (unveröffentlichte Untersuchungen) der Befund von Gonsalvez (Lit. 66) nicht bestätigt.

## 5.2. Sarkoplasmatisches Retikulum

### 5.2.1. Präparation und Charakterisierung des sarkoplasmatischen Retikulum

Wir charakterisierten unsere SR-Präparation durch drei verschiedene Ansätze:

#### 1. Elektronenmikroskopie:

Elektronenoptische Untersuchungen haben nur begrenzte Bedeutung für die Charakterisierung subzellulärer Fraktionen. Es ist möglich, Membranvesikeln zu erkennen, eine Differenzierung in SL, SR oder

sonstige Vesikel kann aber nicht vorgenommen werden. Zusätzliche funktionelle Untersuchungen waren deshalb unerlässlich.

## 2. Markerenzyme:

Durch die Bestimmung von Kennenzymen wichtiger subzellulärer Strukturen konnten wir die Anreicherung unserer isolierten Fraktionen quantifizieren bzw. die Kontamination durch andere Fraktionen messen. Es ergab sich eine Verunreinigung durch Mitochondrien und SL von jeweils etwa 5 %.

Zwei mögliche Einwände lassen sich formulieren:

- a) Markerenzyme könnten durch die Art der Präparation einen Aktivitätsverlust erleiden. Die Präparationsbedingungen sind im Hinblick auf das zu untersuchende Enzym und nicht im Hinblick auf die Markerenzyme optimiert.
- b) Am Beispiel der  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase des SL kann auch gezeigt werden, daß die volle Aktivität nur nach entsprechender Auflösung (Demaskierung) der SL-Vesikel vorhanden ist (Lit. 82). Wir überprüften unsere Präparationen deshalb auch durch spezifisch-biochemische Reaktionen.

## 3. Messung spezifisch biochemischer Reaktionen:

Subzelluläre Strukturen können durch biochemische Funktionen charakterisiert werden, z.B.:

- a) durch Anwendung spezifischer Hemmstoffe,
- b) durch bestimmte Zusammensetzung des Inkubationsmediums.

### Zu 1:

Die Ergebnisse der Charakterisierung durch Hemmstoffe weisen auf eine doppelt so hohe Verunreinigung hin: Durch Natriumazid und Quabain ergaben sich Hemmungen von jeweils 10 %. Das bedeutet eine Kontamination durch SL und Mitochondrien von jeweils 10 %. Daraus folgt, daß die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$ -ATPase nach Abzug der  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität und der  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen mitochondrialen ATPase Aktivität etwa 80 % der Gesamtaktivität ausmacht. Die Aktivitätsbestimmung ohne Kalzium ergibt eine Aktivität von etwa 10 % der Gesamtaktivität. Dies entspricht zu einem gewissen Teil der ATP-Autohydrolyse, zum anderen nicht  $\text{Ca}^{++}$ -abhängiger ATPase-Aktivität (z.B. Lysosomen, nicht  $\text{Ca}^{++}$ -abhängige mitochondriale ATPasen)

Zu 2:

Die Abbildungen 4, 5, 6, 7, 8 zeigen die Schwankungen der gemessenen Enzym-Aktivitäten bei Variation der wesentlichen Bestandteile des Inkubationsmediums. Die gezeigten Abhängigkeiten sind typisch für die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR.

#### 5.2.2. Einfluß von Adriamycin und Adriamycinol auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase

Die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR weist eine enge Kopplung von ATP-Hydrolyse und Kalzium-Transport auf: pro Mol hydrolysiertem ATP werden zwei Mol Kalzium transportiert (Lit. 70).

Die ATP-Spaltung kann als ein indirektes Maß für den Kalzium-Transport angesehen werden.

Die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase wird nur bei hohen Adriamycin-Konzentrationen gehemmt. Konzentrationen von  $10^{-3}$  M oder  $10^{-4}$  M Adriamycin werden unter Therapie mit Adriamycin heute nicht mehr erreicht. Auch durch Präinkubation mit Adriamycin werden die Hemmungen nicht bedeutend erhöht oder zu niedrigeren Konzentrationen verschoben.

Bolusinjektionen, die früher üblich waren, können kurzzeitig sehr hohe Adriamycin-Konzentrationen erzeugen. Wie die multizentrische Studie von Praga et al. (Lit. 124) zeigte, wurden vorwiegend bei Bolusinjektionen oder Dosisüberschreitungen gravierende Adriamycin-Nebenwirkungen beobachtet.

Bei hohen Kalzium-Konzentrationen ( $10^{-4}$  M), die allerdings unphysiologisch sind, wird die ATPase-Aktivität stärker gehemmt. Magnesium ist in unphysiologisch hohen Konzentrationen (8 oder 12 mM) in der Lage, die hemmende Wirkung von Adriamycin abzuschwächen. Aufgrund der hohen Kalzium-Konzentration, welche die in vivo Werte deutlich übersteigt, kann auch nicht der Schluß gezogen werden, daß während oder im Anschluß an die Kontraktion der Herzmuskelzelle die ATPase noch stärker gehemmt wird.

Die Ergebnisse von Moore (Lit. 108) sind bezüglich des Ausmaßes der Hemmungen und der Veränderung der Hemmung bei höheren Kalzium-Konzentrationen vergleichbar.

Die Vermutung, daß Adriamycinol, der Hauptmetabolit von Adriamycin, eventuell eine stärkere Hemmung als Adriamycin bewirken könnte, hat sich nicht bestätigt. Adriamycinol hemmt die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase weniger ausgeprägt als Adriamycin.

Die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR ist nach den vorliegenden Ergebnissen kein direkter Angriffspunkt der Adriamycin-Wirkung, der die kardiotoxischen Nebenwirkungen der Akutphase erklären könnte.

#### 5.2.3. Einfluß von Vinblastin, Vincristin und Endoxan auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase

Andere als kardiotoxisch beschriebene Zytostatika, wie Vinblastin, Vincristin oder Endoxan, hemmen die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR auch bei hohen Konzentrationen nicht. Adriamycin war damit neben dem spezifischen Hemmstoff Vanadat der einzige Hemmstoff dieser ATPase. Die Konzentration, bei der beide Substanzen die ATPase zu 50 % hemmen, liegt allerdings im Falle des Adriamycin um Faktor 100 höher.

#### 5.2.4. Steigerung der $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase durch Calmodulin und c-AMP-abhängige Proteinkinase

Interessant war die Frage, ob Adriamycin auf den von Katz et al. (Lit. 85 ) beschriebenen Calmodulin-stimulierten Aktivitätsanteil der ATPase einen Einfluß hat. Wir konnten durch eine spezielle Präparationsart (Lit. 69 ) diesen Effekt von Calmodulin und der c-AMP-abhängigen Proteinkinase auch messen. Leider war uns wegen der geringen Ausprägung dieses Effektes - etwa 15 % Aktivitätssteigerung sowohl durch Calmodulin als auch durch c-AMP-abhängige Proteinkinase - die Messung einer Adriamycin-Hemmung nicht möglich.

Einen Schluß von der Hemmung der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase der Erythrozyten, deren Calmodulin stimulierter Aktivitätsanteil durch Adriamycin gehemmt wird, auf die Calmodulin-abhängige Stimulation

der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR zu ziehen, ist nicht möglich, da die  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten zu den direkt Calmodulin stimulierten Systemen gehört, während die Stimulation im Fall der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR eine indirekte ist.

### 5.3. Mitochondrien

#### 5.3.1. Präparation und Charakterisierung der Mitochondrien

Ausgehend von der Präparationsmethode von Sordahl et al (Lit. 140) führten wir folgende Veränderungen durch:

1. Aus zeitlichen Gründen und um Herzmuskelgewebe optimal auszunützen, wurde entsprechend vorbehandeltes Homogenat (Gewebereinigung und Homogenisation wie bei der Präparation der SR-Vesikel) weiterverarbeitet.
2. Die Zentrifugationskräfte wurden verringert, um eine geringere Verunreinigung durch Vesikel sarkoplasmatischer oder sarkolemmaler Herkunft zu erreichen. Die Ausbeute wurde dadurch verschlechtert.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Mitochondrien und zahlreiche Vesikel. Eine Zuordnung der Vesikel ist wie oben erwähnt nicht möglich.

Markerenzymatische Tests ergaben eine Kontamination von 15 % SR und 14 % SL. Die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase liegt somit bei etwa 70 % der Gesamtaktivität.

### 5.3.2. Wirkung von Adriamycin und Adriamycinol auf die $\text{Ca}^{++}$ - und $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase

Von den zwei bekannten Kalzium-Transportwegen der Mitochondrien untersuchten wir die  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase. Im Unterschied zu Moore (Lit. 108), der die Wirkung von Adriamycin auf die  $^{45}\text{Ca}$ -Aufnahme testete, bestimmten wir die Hemmung der ATP-Hydrolyse durch Adriamycin. Ähnlich der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR ist auch die mitochondriale  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase nur bei hohen Adriamycin-Konzentrationen ( $10^{-4}$  M -  $10^{-3}$  M) hemmbar. Andere Autoren (Lit. 131, 8, 3) beschreiben ebenfalls hohe Adriamycin-Konzentrationen, die zu Hemmungen der Kalzium-Aufnahme führen. Adriamycinol zeigt bei der mitochondrialen  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase dieselbe Hemmwirkung wie Adriamycin. Auch die  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase der Mitochondrien kann nicht als Ursache der Adriamycin-Wirkung an der Herzmuskelzelle gesehen werden.

### 5.4. Erythrozyten

#### 5.4.1. Wirkung von Adriamycin auf die Calmodulin-stimulierte $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase

Die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -ATPase des Erythrozyten transportiert Kalzium vom Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum und ist in der Lage, einen sehr hohen Konzentrations-Gradienten zwischen Cytosol ( $0,1 \mu\text{Mol}$ ) und Blutplasma ( $1 - 2 \text{ mM}$ ) aufrechtzuerhalten (Lit. 62). Die Basalaktivität der ATPase ist relativ gering, durch Stimulation mit Calmodulin erreicht die ATPase die volle Aktivität (Lit. 62, 156).

Adriamycin hemmt den Anteil der basalen ATPase-Aktivität nicht. Die durch Calmodulin stimulierte ATPase wird im Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$  M ADM zu etwa 10 % gehemmt. Adriamycin verhindert die Interaktion von Calmodulin mit der ATPase. Katoh et al. (Lit. 83) beschrieben ein weiteres Calmodulin-abhängiges System, welches durch Adriamycin gehemmt werden kann: Die Calmodulin-abhängige Phosphorylierung von endogenen Proteinen des Cytosols der Herzmuskelzelle.

Die von Höfling et al. (Lit. 75) nach Adriamycin-Gabe gefundene initiale Abnahme der extrazellulären Kalzium-Konzentration könnte über eine Hemmung der Calmodulin-abhängigen  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$  des Erythrozyten zu einer vermehrten  $\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme in die Erythrozyten führen. Da die Erythrozyten ca. 45 % des Blutvolumens ausmachen, würde ein suffizientes Kompartiment vorliegen, welches für die Abnahme der extrazellulären Kalzium-Konzentration verantwortlich sein könnte.

Adriamycin könnte auch die Calmodulin-stimulierte  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Sarkolemm hemmen, die große Ähnlichkeit mit der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase der Erythrozytenmembran aufweist und ebenfalls direkt durch Calmodulin stimuliert wird (Lit. 156).

Da auch die Myosin-light-chain-Kinase Calmodulin-abhängig ist (Lit. 158), könnte man spekulieren, daß die nach Adriamycin-Injektion beobachtete negativ inotrope Wirkung auf eine Hemmung dieser direkt die elektro- , mechanische Kopplung betreffende Calmodulin-Wirkung zurückzuführen ist.

#### 5.4.2. Wirkung von Vinblastin, DTIC, Endoxan und Bleomycin auf die $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -abhängige ATPase

Die von uns getesteten Zytostatika DTIC, Endoxan und Bleomycin haben keine wesentlich hemmende Wirkung auf den Calmodulin-stimulierten Anteil der Aktivität der  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$  der Erythrozytenmembran. Der bekannte spezifische Hemmstoff Calmodulin-stimulierter Reaktionen - Vinblastin - wurde von uns als Referenzsubstanz benützt, um Adriamycin in seiner Wirkung einordnen zu können. Es zeigte sich, daß von den getesteten Substanzen Adriamycin nach Vinblastin der stärkste Hemmstoff ist.

## 6. Zusammenfassung

Wir untersuchten Kalzium-Transportsysteme der Herzmuskelzelle und des Erythrozyten, die an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt sind. Da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen unterschiedlicher subzellulärer Fraktionen getestet werden sollten, legten wir besonderen Wert auf möglichst reine Präparationen.

Um die spezifische Adriamycin-Wirkung einordnen zu können, haben wir auch andere in der Literatur als kardiotoxisch beschriebene Zytostatika in ihrer Wirkung auf die Kalzium-Transportsysteme überprüft.

### 1. Sarkolemm:

Ein wichtiges Transportsystem von Kalzium durch die Zellmembran, der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch, wurde durch Adriamycin bei Konzentrationen von  $5 \times 10^{-6}$  M bis  $10^{-4}$  M um 7 % bis 54 % reduziert. Konzentrationen von  $10^{-6}$  M Adriamycin können unter Therapie mit Adriblastin erreicht werden.

Die  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase, die indirekt ebenfalls an der Kalzium-Translokation über die Zellmembran beteiligt ist, wurde nicht gehemmt. Wir testeten Adriamycin-Konzentrationen von  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M.

### 2. Sarkoplasmatisches Retikulum:

Die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des SR wurde bei hohen Adriamycin-Konzentrationen (1 mM) zu 55 % gehemmt. Der Hauptmetabolit von Adriamycin, Adriamycinol, hemmte in diesem Konzentrationsbereich um 25 %.

Die Hemmung durch Adriamycin war bei hohen Kalzium-Konzentrationen ( $10^{-4}$  M) ausgeprägter (66 %). Magnesium schwächte in höheren Konzentrationen (12 mM) die Hemmung durch Adriamycin ab. Dieser Befund hat insofern Bedeutung, als nach Adriamycin-Behandlung eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Gehaltes gefunden wird.

Eine Speziesdifferenz zwischen den beiden von uns untersuchten Tierarten Hund und Kalb konnte nicht festgestellt werden.

Vinblastin und Vincristin hatten bei Konzentrationen von 1 mM eine Reduktion der Aktivität um 11 % bzw. 4 % zur Folge. Endoxan hemmte bei den getesteten Konzentrationen (0,01 mM bis 1 mM) nicht.

Adriamycin bewirkte somit von den geprüften Zytostatika die stärkste Hemmung der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase des SR.

### 3. Mitochondrien:

Die ATP-Spaltung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase wurde durch Adriamycin und Adriamycinol in Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-3}$  M um 20 % bzw. 80 % gehemmt. Adriamycin und Adriamycinol hemmten in gleichem Ausmaß. Eine Speziesdifferenz zwischen Hund und Kalb konnte nicht beobachtet werden.

### 4. Die $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten vom Menschen als Beispiel für Calmodulin-abhängige Kalzium-Transportsysteme:

Die basale Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPase wurde von Adriamycin bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-3}$  M nur unwesentlich gehemmt (2 %). Die durch Calmodulin stimulierte ATPase-Aktivität wurde bei einer Adriamycin-Konzentration von  $10^{-4}$  M um 60 % gehemmt.

Vinblastin, der spezifische Hemmstoff der Calmodulin-stimulierten ATPase-Aktivität hemmte bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  M um 70 %.

Somit hemmt nach unseren Untersuchungen Adriamycin den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austausch des Sarkolemm und die Calmodulin-abhängige  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase des Erythrozyten. Die  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -abhängigen ATPasen des SR und der Mitochondrien werden nur bei sehr hohen Konzentrationen inhibiert.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

|           |                                                          |
|-----------|----------------------------------------------------------|
| ADM       | Adriamycin                                               |
| ADMol     | Adriamycinol                                             |
| AMP       | Adenosin Monophosphat                                    |
| ATPase    | ATP-Phosphohydrolase                                     |
| BSA       | Bovine serum albumine                                    |
| cAMP      | cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat                   |
| cpm       | counts per minute                                        |
| DNA       | Desoxyribonucleinsäure                                   |
| DTIC      | Dacarbazine                                              |
| DTNB      | Dithiobis-(2-nitrobenzolsäure)                           |
| EDTA      | Äthylendiamintetraacetat                                 |
| EGTA      | Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure         |
| Hepes     | N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid      |
| $K_M$     | Michaelis-Menten-Konstante                               |
| MOPS      | Morpholinopropansulfonsäure                              |
| NADPH     | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat                  |
| $P_i$     | anorganisches Phosphat                                   |
| RNA       | Ribonukleinsäure                                         |
| rpm       | rotations per minute                                     |
| RT        | Raumtemperatur                                           |
| SDS       | Dodecylsulfat, Na-Salz                                   |
| SL        | Sarkolemm                                                |
| SR        | Sarkoplasmatisches Retikulum                             |
| TCA       | Trichloressigsäure                                       |
| Tris      | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                         |
| $V_{max}$ | Grenzwert der Reaktionsgeschwindigkeit für ( $Na_2ATP$ ) |

8. Literaturverzeichnis

1. Allen G (1980) The primary structure of the calcium-transport adenosine triphosphatase of rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochem.J.* (187): 545-563
2. Amphlett GW, Vanaman TC, Perry SV (1976) Effect of the troponin C-like protein from bovine brain (brain modulator protein) on the  $Mg^{2+}$ -stimulated ATPase of skeletal muscle actomyosin. *FEBS Lett.* (72): 163
3. Anghileri LJ (1977)  $Ca^{2+}$ -transport inhibition by the antitumor agents adriamycin and daunomycin. *Drug Res.* 27 (1), No. 6: 1177-1180
4. Arena E, Arico M, Biondo F, D'Alessandro N, Dusonchet L, Gebbia N, Gerbasi F, Sanguedolce R, Rausa L (1975) Analysis of some probable factors responsible for adriamycin induced cardiotoxicity. *Adriamycin Review* (II):160-172
5. Arnold A, Wolf HU, Ackermann BP (1976) An automated continuous assay of membrane bound and soluble ATPases and related enzymes. *Anal. Biochem.* 71: 209-213
6. Axelrod J, Weinshilboum R (1972) Catecholamines. *N. Engl. J. Med.* (287): 237-242
7. Azuma J, Sperelakis N, Hasegawa H, Tanimoto T, Vogel S, Oguar K, Awata N, Sawamura A, Harada H, Jshiyama T, Morita Y, Yamamura Y (1981) Adriamycin cardiotoxicity: Possible pathogenic mechanisms. *J. Mol. and Cell. Cardiology* (13): 381-397
8. Bachmann E, Zbinder G (1979) Effect of doxorubicin and rubidazone on respiratory function and  $Ca^{2+}$  transport in rat heart mitochondria. *Toxicology Letters* (3): 29-34
9. Bachur NR, Gee M (1971) Daunorubicin metabolism by rat tissue preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (177): 567-572

10. Bachur NR, Hildebrand RC, Jaenke RS (1974) Adriamycin and daunorubicin disposition in the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther* (191): 331-340
11. Bachur NR (1975) Adriamycin (NSC-123127). *Pharmacology. Cancer Chemotherapy Reports Part 3*(6): 153-158
12. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV (1977) Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol. Pharmacol.* (13): 901-910
13. Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RH (1969) The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiology, London* (200): 431-458
14. Beeler GW, Reuter H (1970) Membrane calcium current in ventricular myocardial fibers. *J. of Physiology* (207): 191-209
15. Benjamin RS, Riggs CE, Serpick AA et al. (1974) Biliary excretion of adriamycin (A) in man. *Clin. Rs.* (22): 483
16. Benjamin RS, Riggs CE, Bachur NR (1977) Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in human with normal hepatic and renal function. *Cancer Research* (37): 1416-1420
17. Bensadoun A, Weinstein D (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70: 241-250
18. Bertazzoli C, Ghione M (1977) Adriamycin associated cardiotoxicity: research on prevention with coenzyme Q. *Pharmacol. Res. Comm.* (9): 235-250
19. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer treatm. Rep.* (62): 865-872
20. Billingham ME (1980) Morphologic changes in drug-induced heart disease. In: Bristow MR. (editor): *Meyler and Peck's Drug-induced heart disease*: 127-150
21. Bristow MR, Thompson PD, Martin TP, Mason JW, Billingham ME, Harrison C (1978) Early anthracycline cardiotoxicity. *Am. J. Med.* (65): 823-832

22. Bristow MR, Scott RH, Billingham ME, Daniels JR (1978) Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog. Cardiomyopathy mediated by vasoactive amines? (Abstract). Circulation 58 (Suppl. II): II-19
23. Bristow MR, Billingham ME, Minobe WA, Masek MA, Daniels JP (1979) Demonstration that adriamycin cardiotoxicity is mediated by vasoactive amines. J. Molec. Cell Cardiol. 11 (Suppl. 1): 10
24. Bristow MR (1980) Anthracycline cardiotoxicity. In: Bristow MR (editor): Meyler and Peck's Drug-induced heart disease: 191-215
25. Bühner R, Biedert S, Miura D (1980) Erhöhung des frei-ionisierten zytoplasmatischen Calciums als Ursache der Adriamycin-Kardiomyopathie. Klin. Wochenschr. (58): 747-748
26. Butcher RW, Sutherland EW (1962) Adenosine 3',5'-Phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3', 5'-phosphate in human urin. J. Biol. Chem. /237): 1244
27. Calabresi P, Parks RE (1980) Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. In: Goodman Gilman A, Goodman LS, Gilman A (eds.): The Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan Publishing Co.: 1291-1293
28. Carafoli E, Lehninger AL (1971) A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. Biochem. J. (122): 681-690
29. Carafoli E, Crompton M (1978) The regulation of intracellular calcium by mitochondria. Annals of the New York Academy of Sciences (307): 269-284
30. Carmichael SM, Eagleton L, Ayers CR and Mohler D (1970) Orthostatic hypotension during vincristine therapy. Arch. Intern.Med. (126): 290

31. Caroni P, Reinlib L, Carafoli E (1980) Charge movements during the  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (77), No. 11: 6354-6358
32. Caroni P, Carafoli E (1980) An ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature* (283), No. 5449: 765-767
33. Caroni P, Villani F, Carafoli E (1981) The cardiotoxic antibiotic doxorubicin inhibits the  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  exchange of dog heart sarcolemmal vesicles. *FEBS Lett.* (130), No.2: 184-186
34. Caroni P, Carafoli E (1981) The  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of heart sarcolemma. *J. Biol. Chemistry* (256), No. 7: 3263-3270
35. Carter SK (1980) The clinical evaluation of analogs-III. Anthracyclins. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (4): 5-10
36. Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* (207): 19-27
37. Chlebowsky RT, Paroly WS, Pugh RP, Hueser J, Jacobs EM, Pajak TF, Bateman JR (1980) Adriamycin given as a weekly schedule without a loading course: Clinically effective with reduced incidence of cardiotoxicity. *Cancer Treat. Rep.* (64): 47-51
38. Cortes EP, Lutman G, Wanka J, Wang JJ, Pickren J, Wallace J, Holland JF (1975) Adriamycin (NSC 123127) cardiotoxicity: a clinicopathologic correlation. *Cancer Chemother. Rep.* 6: 215-225
39. Creech RH, Catalano RB, Shah MK (1980) An effective low-dose adriamycin in regimen as secondary chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Cancer* (46): 433-437
40. Crompton M, Heid I, Carafoli E (1980) The activation by potassium of the sodium-calcium carrier of cardiac mitochondria. *FEBS Lett.* (115), No. 2: 257-259
41. Daniels JR, Billingham ME, Gelbart A, Bristow MR (1976) Effect of verapamil and propranolol on adriamycin-induced cardiomyopathy in rabbits. (Abstract) *Circulation* 54: II-20

42. Dasdia T, Di Marco A, Minghetti A, Necco A (1979) Effect of doxorubicin on calcium exchange of cultured heart cells. *Pharm. Res. Comm.* (11), No. 10: 881-889
43. DeLena M, Guzzon A, Monfardini S, Bonadonna G (1972) Clinical, radiological and histopathologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin. *Cancer Chemother. Rep.* 53: 343
44. DeVita VT (1980) Principles of cancer therapy. In: Isselbacher KR, Adams RD, Braunwald E, Petersdorf RG, Wilson JE (eds.): *Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Book Company: 1597-1619
45. Dhalla NS, Ziegelhoffer A, Harrow JAC (1977) Regulatory role of membrane systems in heart function. *Canadian J. of Physiology and Pharmacology* (55), No. 6: 1211-1234
46. Dietze G, Hepp KG (1971) Calcium stimulated ATPase of cardiac sarcolemma. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* (44), No. 5: 1041
47. DiMarco A (1975) Adriamycin (NSC-123127). Mode and mechanism of action. *Cancer Chemotherapy Reports* 6: 91-106
48. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE (1979) Prevention of doxorubicin cardiac toxicity by N-acetyl-L-cysteine. *Proc. Am. Assoc. Can. Res. and ASCO* (20): 253
49. Driscoll JS, Hazard GF, Wood HB et al. (1974) Structure-antitumor activity relationship among quinone derivatives. *Cancer Chemother. Rep. Part 2* (4): 1-362
50. Drummond GI, Duncan L (1970) Adenyl cyclase in cardiac tissue. *J. Biol. Chem.* (245): 976-983
51. Egorin MJ, Hildebrand RC, Cimino EF et al. (1974) Cytofluorescence localization of adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res.* (34): 2243-2245
52. Erdmann E, Philipp G, Scholz H (1980) Cardiac glycoside receptor, ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase activity and force of contraction in rat heart. *Biochem. Pharmacol.* (29): 3219-3229

53. Feingold ML, Koss LG (1969) Effects of long-term administration of busulfan. Arch. Intern. Med. (125): 66
54. Felstedt RL, Gee M, Bachur NR (1974) Rat liver daunorubicin reductase, an aldo-keto reductase. J. Biol. Chem. (249): 3672-3679
55. Ferrans VJ, Herman E (1978) Cardiomyopathy induced by antineoplastic drugs. In: Cardiomyopathy and myocardial biopsy. Kaltenbach M, Loogen F, Olsen EGJ (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 12-26
56. Ferrans VJ (1978) Overview on cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. Cancer Treat Rep. 62: 955-961
57. Fiske H, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. J. of Biol. Chem. (66), No. 2: 375
58. Fiskum G, Lehninger AL (1980) The activation by potassium of the sodium-calcium carrier of cardiac mitochondria. FEBS Lett. (115), No. 2: 257-259
59. Fleckenstein A (1971) In: Calcium and the heart. Ed. by P. Harris and L. Opie. Academic press, Inc. London: 135-188
60. Ganzina F (1983) 4'-epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. Cancer Treatment Reviews (10): 1-22
61. Ghione M (1978) Cardiotoxic effects of antitumor agents (Review). Cancer Chemother. Pharmacol. (1): 25-34
62. Gietzen K (1980) Untersuchungen zur Isolierung und Rekonstitution der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase der Humanerythrozyten. Dissertation, Universität Ulm
63. Gietzen K, Bader H (1980) Effects of vinblastine and colchicine on calmodulin-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase of human erythrocytes. IRCS Medical Science (8): 396-397
64. Goodman M, Pechère JF, Haiech J, Demaille JG (1979) Evolutionary diversification of structure and function in the family of intracellular calcium-binding proteins. J. of Mol. Evolution (13): 331-352

65. Goodwin JF, Roberts WC, Kass Wenger N (1982) Cardiomyopathy.  
In: Hurst JW (editor). The Heart. McGraw-Hill Book Company: 1299-1362
66. Gosalvez M, Van Rossum GDV, Blanco MR (1979) Inhibition of sodium-potassium-activated adenosine 5'-triphosphatase and ion transport by adriamycin. *Cancer Res.* (39): 257-261
67. Handa, Kazuko, Sato (1975) Generation of free radicals of quinone group containing anticancer chemicals in NADPH-Microsome system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann* 66: 43-47
68. Harigaya S, Schwartz A (1969) Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle. Membran vesicles (relaxing system) and mitochondria. *Circ. Res.* (25): 781
69. Hartweg D (1984) Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums des Herzens: Charakterisierung, Rekonstitution und Untersuchungen zur Calmodulinabhängigkeit des Enzyms. Dissertation, Universität Ulm
70. Hasselbach W, Makinose M (1961) Die Calciumpumpe der Erschlaffungsgrana des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z* (333): 159
71. Hasselbach W, Makinose M (1963) Über den Mechanismus des Calcium-Transports durch die Membran des SR. *Biochem. Z* 339: 94
72. Hasselbach (1978) The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. *Biochimica et Biophysica Acta* 515: 23-53
73. Henderson JC, Frei E (1980) Adriamycin cardiotoxicity. *American Heart Journal* (99), No. 5: 671-674
74. Herman E, Young R, Krops S (1978) Doxorubicin-induced hypotension in the beagle dog. *Agents Action* 8/5: 551-557
75. Höfling B, Bolte HD (1981) Acute negative inotropic effect of adriamycin (doxorubicin). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (317): 252-256

76. Höfling B (Hrsg.) (1984) Die Anthracyclin-Kardiotoxizität. Kehrler-Verlag, Freiburg
77. Hüttner I (1980) The sarcolemma. In: Bristow MR (editor): Meyler and Peck's Drug-induced heart disease: 3-38
78. Iwamoto Y, Hansen IL, Porter TH, Folkers K (1974) Inhibition of coenzyme  $Q_{10}$ -enzymes, succinoxidase and NADH-oxidase by adriamycin and other quinones having antitumor activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. (58): 633-638
79. Jaenke RS (1976) Delayed and progressive myocardial lesions after adriamycin administration in the rabbit. Cancer Res. (36): 2958-2966
80. Jaqua-Stewart MJ, Read WO, Steffen RP (1979) Isolation of pure myocardial subcellular organelles. Analytical Biochemistry (96): 293-297
81. Jarret HW, Penniston JT (1978) Purification of the  $Ca^{2+}$ -stimulated ATPase activator from human Erythrocytes. J. Biol. Chem. (253): 4676
82. Jones LR, Maddock W, Besch HR (1980) Unmasking effect of alamethicin on the  $(Na^+, K^+)$ -ATPase  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependend protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. J. Biol. Chem. (255), No. 20: 9971-9980
83. Katoh N, Wise BC, Wrenn RW, Kuo JF (1981) Inhibition of adriamycin of calmodulin-sensitive and phospholipid-sensitive calcium-dependend phosphorylation of endogenous proteins from heart. Biochem. J. (198): 199-205
84. Katz AM, Repke DI, Upshaw JE, Polascik MA (1970) Characterisation of dog cardiac microsomes. Use of zonal centrifugation to fractionate fragmented sarcoplasmic reticulum  $(Na^+-K^+)$ . Biochim. Biophys. Acta (205): 473
85. Katz S, Remtulla MA (1978) Phosphodiesterase protein activator stimulates calcium transport in cardiac microsomal preparations enriched in SR. Biochem. Biophys. Res. Comm. (83): 1373-1379

86. Kidwai AM, Radcliffe MA, Duchon G, Daniel EE (1971) Isolation of pure myocardial subcellular organelles. *Analytical Biochemistry* (96): 293-297
87. Kimball JC, Lantin E, Wang YM (1979) Vitamin E and N-acetyl-L-cysteine modification of adriamycin toxicities. *Proc. Am. Assoc. Can. Res. and ASCO* (20): 188
88. Klingenberg M (1970) Overview on mitochondrial metabolite transport systems. *Essays Biochem.* (6): 199
89. Krawietz W, Poppert D, Erdmann E, Glossmann H, Struck CJ, Konrad C (1976)  $\beta$ -adrenergic receptors in guinea pig myocardial tissue. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (295): 215
90. Langer GA (1964) Kinetic studies of calcium distribution in ventricular muscle of the dog. *Circ. Res.* (15): 393-405
91. Langer GA (1977) Relationship between myocardial contractility and the effects of digitalis on ionic exchange. *Fed. Proc.* (36): 2231-2234
92. Langer GA (1980) The role of calcium in the control of myocardial contractility: An update. *J. Mol. and Cell. Cardiol.* (12), No. 3: 231-239
93. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA (1973) A clinico-pathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* (32): 302-314
94. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, Rasmussen SL, Blumenschein GR, Freireich E (1982) Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Annals of Internal Medicine* (96): 133-139
95. Lehninger AL (1974)  $\text{Ca}^{++}$ -transport by mitochondria and its possible role in the cardiac contraction-relaxation cycle. *Circ. Res.* (35), Suppl. 3: 83-90
96. Lehninger AL, Reynafarje B, Vercesi A, Tew WP (1978) Transport and accumulation of calcium in mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences* (307): 160-176

97. Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG (1979) Concerted regulation of cardiac SR calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* (18), No. 23: 5150-5157
98. Liss RH (1974) In: *Proceedings 11th International Cancer Congress*: 369
99. Liu YP, Cheung WY (1976) Cyclic 3':5' nucleotide phosphodiesterase  $\text{Ca}^{++}$  confers more helical conformation to the protein activator. *J. Biol. Chem.* 251: 4193-4198
100. Löser H, Pfister S, Fischbach H, Apitz J (1977) Die kardiotoxische Wirkung des Zytostatikums Adriamycin. *Pädiat. Prax.* (18): 233-242
101. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. of Biol. Chem.* (193): 265-275
102. Mandel EM, Lewinsky U, Djalldetti M (1975) Vincristine-induced myocardial infarction. *Cancer* (36): 1979
103. Martonosi A, Donley J, Halpin RA (1968) SR III: The role of phospholipids in the adenosine triphosphatase activity and  $\text{Ca}^{2+}$ -transport. *J. Biol. Chem.* (243): 61-70
104. Martonosi A (1972) Biochemical and clinical aspects of sarcoplasmic reticulum function. In: *Current Topics in Membranes and Transport* (eds.) Bronner and Kleingeller, Academic Press (3): 83
105. Means AR, Dedman JR (1980) Calmodulin - an intracellular calcium receptor. *Nature* (285): 73-77
106. Meriwether WD, Bachur NR (1972) Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L 1210 mouse leukemia. *Cancer Res.* (32): 1137-1142
107. Minow R, Benjamin R, Gottlieb J (1975) Adriamycin (NSC 123127) cardiomyopathy - an overview with determination of risk factors. *Cancer Chemother. Rep.* 3: 195-201

108. Moore L, Landon EJ, Cooney DA (1976) Inhibition of the cardiac mitochondrial calcium pump by adriamycin in vitro. *Biochemical Medicine* (18): 131-138
109. Morre JD (1971)  $5'$ Nucleotidase and glucose-6-phosphatase. In: *Methods in Enzymology* (22): 137-138
110. Mullins LJ (1979) The generation of electric currents on cardiac fibers by  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  exchange. *Am J. Physiol.* (236): 103-110
111. Myers CE, McGuire W, Your R (1976) Adriamycin: Amelioration of toxicity by alpha-tocopherol. *Cancer Treat.* (60): 961-962
112. Myers CE, McGuire W, Liss RH, Grothinger K, Young RC (1977) Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197: 165-167
113. Nayler WG, Merrilllees NCR (1971) Cellular exchange of calcium. In: *Calcium and the Heart* (eds.) Harris and Opie, Academic Press, London: 24
114. Nayler WG (1975) The cardiac cell. In: *Contraction and relaxation in the myocardium* ed. by W.G. Nayler, Academic Press, London: 1-28
115. New W, Trautwein W (1972) Ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. *Pflüglers Archive. European J. of Physiology* (334): 1-23
116. Niggli V, Penniston JT, Carafoli E (1979) Purification of the  $(\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++})$ -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* (254), No. 20: 9955-9958
117. Ohuchi K, Levine L (1978) Adriamycin stimulates canine kidney (MDCK) cells to deacylate cellular lipids and to produce prostaglandins. *Prostaglandins Med.* 1: 433-439
118. Olson HM, Young DM, Prieur DJ, LeRoy AF, Reagan RL (1974) Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am. J. Pathol.* (77): 493-450

119. Packer L, Mehard CW, Meissner G, Zahler WL, Fleischer S (1974) The structural role of lipids in mitochondria and sarcoplasmic reticulum membrane. Freeze-fracture electronmicroscope studies. *Biochim. Biophys. Acta* 363: 159-181
120. Perry SV (1975) The contractile and regulatory proteins of the myocardium. In: contraction and relaxation in the myocardium. Ed. by W.G. Nayler, Academic Press, London: 29-79
121. Pigram WJ, Fuller W, Hamilton LD (1972) Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nature New Biol.* (235): 17-19
122. Pitts BJR (1979) Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *J. of Biological Chem.* (254): 6232-6235
123. Post RL, Sen AK (1976) Sodium and potassium-stimulated ATPase. *Methods in Enzymology* 10 (116): 762-768
124. Praga C, Beretta G, Vigo PL, Lenaz GR, Pollini C, Bonadonna G, Canetta R, Castellani R, Villa E, Gallagher CG, Von Melcher H, Hayat M, Ribaud P, De Wasch D, Matsson W, Heinz R, Waldner R, Kolaric K, Bühner R, Ten Bokkel-Huyninck W, Perevodchikova NI, Manziuk LA, Mayr AC, Senn HJ (1979) Adriamycin carditoxicity, a survey of 1273 patients. *Cancer Treatm. Rep.* 63: 827-834
125. Prout MN, Richards MJS, Chung KG, Joo P, Davis HL (1977) Adriamycin cardiotoxicity in children. *Cancer* 39 (1): 62-65
126. Reinlib L, Caroni P, Carafoli E (1981) Studies on heart sarcolemma: Vesicles of opposite orientation and the effect of ATP on the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *FEBS Lett.* (126), No. 1: 74-76
127. Reuter H, Seitz N (1967) Untersuchungen zur Kinetik des  $^{45}\text{Ca}^{++}$  Efflux von MeerschweinchenVorhöfen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* (257): 324
128. Reuter H (1973) Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (26): 1-43

129. Reuter H (1974) Exchange of calcium ion in the mammalian myocardium. *Circulation Research* (XXXIV), No. 5: 599-605
130. Reuter H (1982) Na-Ca countertransport in cardiac muscle. In: *Membranes and Transport* (1) (ed. A. Maronosi). Plenum Press, New York: 623-631
131. Revis NW, Marusic N (1979) Effects of doxorubicin and its aglycone metabolite on calcium sequestration by rabbit heart, liver, and kidney mitochondria. *Life Sciences* (25): 1055-1064
132. Rinehart JJ, Lewis RP, Balcerzack SP (1974) Adriamycin cardiotoxicity in man. *Ann. Int. Med.* 81 (4): 475-478
133. Rosenoff SH, Brooks E, Bostick F, Young RC (1975) Alterations in DNA synthesis in cardiac tissue induced by adriamycin in vivo - relationship to fatal toxicity. *Biochem. Pharmacol.* (24): 1898-1901
134. Rosenoff SH, Olson HM, Young DM, Bostick F, Young RC (1975) Adriamycin-induced cardiac damage in the mouse: a small animal model of cardiotoxicity. *J. Nat. Cancer Inst.* (55): 191-194
135. Scarpa A, Graziotti P (1973) Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. *J. Gen. Physiol.* (62): 765-772
136. Skou JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 349-401
137. Solaro RJ, Briggs FN (1974) Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *Circ. Res.* (34): 531-540
138. Solomonson LP, Halabrin PR (1981) Cardiac sodium, potassium-adenosine triphosphatase as a possible site of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cancer Res.* (41): 570-572
139. Sonneveld P (1977) Effect of alpha-tocopherol on the cardiotoxicity of adriamycin in the rat. *Cancer Treat Rep* 62: 1033-1036

140. Sordahl LA, Johnson C, Blailock ZR (1971) The mitochondrion. In: Methods in Pharmacology (1), Kap. 8: 247-286
141. Srere PA (1969) Citrat Synthase. In: Methods in Enzymology (13): 3-11
142. Suko J, Hasselbach W (1976) Characterization of cardiac sarco-plasmic reticulum ATP-ADP-Phosphate exchange and phosphorylation of the calcium transport adenosine triphosphatase. Eur. J. Biochem. (64): 123-130
143. Sulakhe PV, Dhalla NS (1971) Excitation-contraction coupling in heart. VI. Demonstration of calcium activated ATPase in the dog heart sarcolemma. Life Sciences (10), Part I: 185-191
144. Sutherland EW, Oye I, Butcher RW (1965) The action of epinephrine and the role of the adenylyl cyclase system in hormone action. Recent. Progr. Hormone Res. (21): 623-646
145. Schatzmann HJ (1953) Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran. Helv. Physiol. Acta 11: 346-354
146. Schneider JA, Spereelakis N (1975) Slow  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  responses induced by isoproterenol and methylxanthines in isolated perfused guinea-pig hearts\_exposed to elevated  $\text{K}^{+}$ . J. of Mol. Cell. Card. 7: 249-273
147. Steward DJ (1974) Sensitive automated methods for phosphate and ( $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ )-ATPase. Anal. Biochem. (62): 349-364
148. Tada M, Yamamoto T, Tonomura Y (1978) Molecular mechanism of active calcium transport. Physiological Reviews (58), No. 1: 1-79
149. Teshima Y, Kakiuchi S (1974) Mechanisms of stimulation on  $\text{Ca}^{++}$  +  $\text{Mg}^{++}$ -dependent phosphodiesterase from rat cerebral cortex by the modulator protein and  $\text{Ca}^{++}$ . Biochem. Biophys. Res. Commun. (56): 489
150. Tisdale HD (1967) Preparation and properties of succinic-cytochrome reductase (complex II-III). In: Estabrook RW, Pullman ME (eds.) Methods in Enzymology 10, Academic Press, New York: 213-215

151. Toussant R, Löser H, Stupperich E, Bachour G (1979) Myokard-infarkt nach Injektion von Adriamycin. *Herz/Kreisl.* 11: 363
152. Trautwein W (1973) Membrane currents in cardiac muscle fibers. *Physiol. Rev.* (53): 793-835
153. Tsien RW, Giles W, Greengard P (1972) Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac purkinje fibres. *Nature* (240): 181-183
154. Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE (1980) Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and in evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am. J. Pathol.* 99 (1): 13-42
155. Villani F, Piccinini F, Merelli P, Fafalli L (1978) Influence of adriamycin on calcium exchangeability in cardiac muscle and its modification by quabain. *Biochem. Pharmacol.* (27): 985-987
156. Vincenzi FF, Farrance ML (1977) Interaction between cytoplasmic ( $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ )-ATPase activator and the erythrocyte membran. *J. Supramol. Structure* (7): 301-306
157. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Von Hoff AL, Rosencweig M, Muggia FM (1979) Risk factors for doxorubicin-induced heart failure. *Ann. Intern. Med.* (91): 710-717
158. Walsh MP, Le Peuch CJ, Vallet B, Cavadore JC, Demaille J (1980) Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction. *J. of. Mol. and Cell. Cardiol.* (12): 1091-1101
159. Wang T, Tsai LI, Solaro RJ, Grassi de Gende AO, Schwartz A (1979) Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. *Biochimica and Biophysica* (91), No. 1: 356-361
160. Watterson DM, Harrelson WG, Keller PM, Sharief F, Vanaman TC (1976) Structural similarities between the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulatory proteins of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase and actomyosin ATPase. *J. Biol. Chem.* (251), No. 15: 4501-4513

161. Weiss AJ, Manthel RW (1977) Experience with the use of adriamycin in combination with other anticancer agents using a weekly schedule, with particular reference to lack of cardiac toxicity. *Cancer* 40: 2046-2052
162. Wierichs R, Hagenmeyer A, Bader H (1980) Influence of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  on the vanadate inhibition of the  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase from pig heart sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (92), No. 4: 1124-1129
163. Winegrad S, Shanes M (1962) Calcium flux and contractility in guinea-pig atria. *J. Gen. Physiol.* (45): 371-374
164. Wolff DJ, Poirier PG, Brostrom CO, Brostrom MA (1977) Divalent cation binding properties of bovine brain  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulator protein. *J. of Biol. Chem.* (252): 4108-4117
165. Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D et al. (1972) Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res.* (32): 1177-1183
166. Yesair DW, Bittman L, Schwartzbach E (1974) Pharmacodynamic significance of metal chelates of the anthracycline drugs (NSC 82151) and (NSC 123127). *AACR Abstracts* (285): 72
167. Young DM (1975) Pathologic effects of adriamycin (NSC-123127) in experimental systems. *Cancer Chemother. Rep.* 6, Part. 3: 159-175
168. Young DM (1977) Effect of coenzyme  $\text{Q}_{10}$  on adriamycin cardiotoxicity in rabbits. Presented at the 2nd conference on anthracycline cardiotoxicity. SRI International, Nelo Park, Ca.
169. Zähringer J, Höfling B, Bolte HD, Raum W, Kandolph R (1979) Adriamycin-cardiomyopathy: decrease in myocardial DNA, RNA, m-RNA, polyribosomes and protein synthesis rates. *Proc. Int. Con. Biochem.* 12 (4): 659
170. Zähringer J, Höfling B, Raum W, Kandolph R (1980) Effect of adriamycin on the polyribosome and messenger-RNA content of the rat heart muscle. *Biochem. Biophys. Acta* 608: 315-323

171. Zak R (1973) Cell proliferation during cardiac growth.  
Am. J. Cardiol. (31): 211-219

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. B. Höfling für die Überlassung des Themas, zahlreiche fruchtbare Diskussionen und die großzügigen Bedingungen, unter denen ich die vorliegende Arbeit durchführen durfte.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Carafoli für den zweimonatigen Aufenthalt am Institut für Biochemie III der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich. Frau Dr. D. Hartweg, Herrn Prof. Bader und Herrn Dr. Gietzen vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm danke ich für die Betreuung bei zahlreichen Arbeitsbesuchen. Beiden Instituten bin ich für ihre Anleitungen und vielen Ratschläge, die den Fortgang der Arbeit wesentlich beschleunigten, sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Hübner vom Pathologischen Institut der Universität München danke ich für die elektronenoptischen Untersuchungen der Präparationen.

Für die zuverlässige Durchführung zahlreicher Messungen möchte ich mich bei Fräulein Lauer mann (medizinisch-technische Assistentin) und den Herren A. Stäblein, C. Wittenzellner und R. Koch (Zivildienstleistende) herzlich bedanken.

Der Wilhelm-Sander-Stiftung danke ich für die Bereitstellung der Sach- und Personalbeihilfen.

10. Lebenslauf

Name: Peter Anton Rosenbeiger

Geburtsdaten: München, 18. April 1956

Eltern: Anton Rosenbeiger, techn. Angestellter  
Helga Rosenbeiger, Sekretärin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 4 Jahre Volksschule in München,  
9 Jahre mathematisch-naturwissenschaft-  
liches Gymnasium in München,  
Juni 1975 Abitur am Asam-Gymnasium in München.

Praktische Tätigkeit: August bis November 1975 Werkstudent bei  
Firma SIEMENS - Unternehmensbereich Daten-  
verarbeitung.  
Dezember 1975 bis Februar 1976 Krankenpflege-  
praktikum an der Chirurgischen Klinik der  
techn. Universität München.

Hochschulbildung: Mai 1976: Beginn des Studiums der Humanmedizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
1978: Ärztliche Vorprüfung  
Seit Oktober 1979: Studium der Psychologie,  
Philosophie, Psychiatrie, Psychopathologie  
und Psychosomatik an der Paris-Lodron-Univer-  
sität in Salzburg.  
1980: 1. medizinisches Staatsexamen  
April 1980: Beginn der Arbeit an der medizini-  
schen Dissertation.  
April 1981 bis Mai 1982: Ganztägige Arbeit an  
der Dissertation.  
August 1981: Aufenthalt am Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Ulm (Prof. Bader, Dr. Gietzen).  
November/Dezember 1981: Aufenthalt am Institut  
für Biochemie III der Eidgenössischen tech-  
nischen Hochschule Zürich (Prof. Carafoli).

1982: 2. medizinisches Staatsexamen  
1982: Praktisches Jahr (1. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern; Chirurgische Universitätsklinik, Klinikum Großhadern; Universitätsaugenklinik)  
April 1983: 3. medizinisches Staatsexamen  
Juni 1983: Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit: Seit 4. Juli 1983 Stabsarzt beim Geb. Art. Bat. 235 in Bad Reichenhall



